



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

**METABOLITOS AISLADOS DEL EXTRACTO
METANÓLICO DE HOJAS DE *APHELANDRA
SCABRA* CON ACTIVIDAD ANTIGIARDIÁSICA**

Tesis que presenta

GLORIA IVONNE HERNÁNDEZ BOLIO

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción Biotecnología



Mérida, Yucatán, México

Enero de 2013





RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado “Metabolitos aislados del extracto metanólico de hojas de *Aphelandra scabra* con actividad anti-giardíasis” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez, dentro de la Opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

**Dr. Felipe A. Vázquez Flota
Coordinador de docencia
Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.**

Mérida, Yucatán, México; a 11 de enero de 2013

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Gloria Ivonne Hernández Bolio

DEDICATORIAS

A mis padres Manuel y Gloria, porque con su amor me han impulsado a seguir adelante y con su ejemplo me han inspirado para continuar en el camino de la ciencia. A mis hermanos Manuel y Lupita, por su cariño y apoyo en todo momento.

A mis abuelos, Manuel[†] y Gloria, Juan[†] y Candelaria, por compartir conmigo sus sabios consejos y enseñarme a mirar la vida desde una perspectiva diferente.

A mi familia, por estar siempre pendientes de mi formación en todos los aspectos y por el gran cariño y amor que, a pesar de la distancia, puedo sentir reanimándome todos los días.

A Javier, por permanecer a mi lado a cada momento y apoyarme en la realización de este proyecto.

A Lilus y Ale, mis hermanas, gracias por hacer de ésta una etapa especial y por su linda amistad.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero a través del proyecto de Ciencia Básica 105346 con título: "Aislamiento y evaluación *in vitro* de metabolitos de plantas nativas de Yucatán con actividad antiprotozoaria" y por la beca mensual con número 255076.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por las facilidades para la realización de este proyecto, en especial a la Unidad de Biotecnología y a la Subdirección de Posgrado por su amable y siempre cálida atención.

A los miembros de mi comité tutorial, M.C. Aída Rosa Pérez Espadas y Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota, por el valioso tiempo que dedicaron a mi formación y las importantes contribuciones que ofrecieron a este trabajo.

A mi comité revisor, Dra. Cecilia Mónica Rodríguez García y Dr. Roberto Cedillo Rivera, por los valiosos comentarios y sugerencias aportados para la realización de este documento de tesis.

A los técnicos, M.C. Luis Torres Tapia y M.C. Alejandra Barraza Morales, por su inestimable guía y apoyo en la parte fitoquímica, y por brindarme su sincera amistad.

A mis compañeros del laboratorio de Productos Naturales, Magda, Dari, Deysi, Karely, Glendy, Ana, Carlitos, Angelito May, Marina, Arely, Ana Lilia y Angelito Cruz, a quienes agradezco su amistad y los gratos momentos junto a ellos.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer al Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez, quien en su calidad de maestro me ha guiado y transmitido los conocimientos necesarios para mi formación en la investigación. Le agradezco también haber depositado en mí su confianza para llevar a cabo este proyecto.

ÍNDICE

	LISTA DE ABREVIATURAS	iv
	ÍNDICE DE FIGURAS	v
	ÍNDICE DE CUADROS	viii
	RESUMEN	1
	ABSTRACT	2
	CAPÍTULO I. Planteamiento del trabajo	
1.	Introducción	3
2.	Antecedentes	4
2.1	Giardiasis	4
2.2	<i>Giardia lamblia</i>	4
2.2.1	Ciclo vital de <i>Giardia lamblia</i>	5
2.3	Tratamiento de la giardiasis	6
2.3.1	Nitroimidazoles	6
2.3.2	Bencimidazoles	10
2.3.3	Quinacrina	11
2.3.4	Furazolidona	11
2.3.5	Paromomicina	12
2.3.6	Nitazoxanida	12
2.4	Actividad anti-giardiasis de extractos vegetales	13
2.5	Productos naturales con actividad anti-giardiasis	15
2.6	<i>Aphelandra scabra</i>	18
2.6.1	Generalidades	18
2.6.2	Estudio fitoquímico del género <i>Aphelandra</i>	20
3.	Objetivos	25
3.1	Objetivo general	25
3.2	Objetivos específicos	25
4.	Hipótesis	25
5.	Justificación	26
6.	Estrategia experimental	26
7.	Referencias	28

**CAPÍTULO II. Purificación de metabolitos secundarios
de *Aphelandra scabra* por métodos cromatográficos**

1.	Introducción	35
2.	Materiales y métodos	36
2.1	Procedimientos generales	36
2.2	Localización geográfica	37
2.3	Colecta de la planta	37
2.4	Procesamiento y extracción del material vegetal	37
2.5	Partición del extracto metanólico	38
2.6	Purificación de la fracción hexánica	39
2.6.1	Aislamiento del compuesto 1	39
2.7	Purificación de la fracción diclorometánica	40
2.7.1	Aislamiento del compuesto 2	40
2.8	Purificación de la fracción de acetato de etilo	41
2.8.1	Aislamiento del compuesto 3	41
2.8.2	Aislamiento de compuesto 4	43
2.8.3	Aislamiento del compuesto 5	44
3.	Resultados y discusión	46
3.1	Procesamiento y extracción del material vegetal	46
3.2	Aislamiento de metabolitos	47
3.2.1	CLV de la fracción hexánica	47
3.2.1.1	Análisis del compuesto 1	47
3.2.2	CLV de la fracción diclorometánica	49
3.2.2.1	Análisis del compuesto 2	50
3.2.3	CLV de la fracción de acetato de etilo	54
3.2.3.1	Análisis del compuesto 3	54
3.2.3.2	Análisis del compuesto 4	58
3.2.3.3	Análisis del compuesto 5	61
4.	Referencias	65

CAPÍTULO III. Actividad anti-giardíaca *in vitro* del extracto metanólico y metabolitos aislados de *A. scabra*

1.	Introducción	69
2.	Materiales y métodos	70
2.1	Determinación de la actividad anti-giardíaca <i>in vitro</i> del extracto metanólico y fracciones de <i>A. scabra</i>	70
2.2	Determinación de la actividad anti-giardíaca <i>in vitro</i> de los metabolitos aislados de <i>A. scabra</i>	71
2.3	Determinación de la citotoxicidad <i>in vitro</i> de los compuestos activos cirsimaritina y sorbifolín	71
3.	Resultados y discusión	71
3.1	Actividad anti-giardíaca <i>in vitro</i> del extracto metanólico y fracciones de <i>A. scabra</i>	71
3.2	Actividad anti-giardíaca <i>in vitro</i> de metabolitos aislados de <i>A. scabra</i>	73
3.3	Citotoxicidad <i>in vitro</i> de los compuestos activos cirsimaritina y sorbifolín	75
4.	Referencias	77

CAPÍTULO IV. Discusión y conclusiones generales

1.	Discusión general	79
2.	Conclusiones generales	80
3.	Perspectivas	81
4.	Referencias	82

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	Desplazamiento químico en partes por millón
ε	Coefficiente de extinción en molar
AcOEt	Acetato de etilo
An	Acetona
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCG	Cromatografía en columna por gravedad
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CLV	Cromatografía líquida al vacío
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetilsulfóxido deuterado
ED ₅₀	Dosis efectiva al 50%
EtOH	Etanol
HEK-293	Línea celular normal de células embrionarias de riñón humano
Hx	Hexano
IC ₅₀	Concentración inhibitoria al 50%
IR	Espectroscopía de infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>m/z</i>	Relación masa-carga en espectrometría de masas
MeOH	Metanol
ppm	Partes por millón
R _f	Factor de retención
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono
T _R	Tiempo de retención
UV	Espectroscopía de luz ultravioleta
ν_{\max}	Número de onda

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Diagrama de <i>Giardia lamblia</i>	5
Figura 2 Ciclo biológico de <i>Giardia lamblia</i>	6
Figura 3 Estructura química de los fármacos de la familia de los nitroimidazoles	9
Figura 4 Estructura química de los fármacos de la familia de los bencimidazoles	10
Figura 5 Estructura química de otros fármacos empleados en el tratamiento de <i>G. lamblia</i>	13
Figura 6 Estructuras químicas de productos naturales con actividad anti <i>giardiásica</i>	17
Figura 7 <i>Aphelandra scabra</i>	19
Figura 8 Estructuras químicas de los alcaloides de tipo espermina aislados del género <i>Aphelandra</i>	22
Figura 9 Estructuras químicas de los benzoxazinoides aislados del género <i>Aphelandra</i>	22
Figura 10 Estructuras químicas de las cumaroil-espermidinas aisladas en el género <i>Aphelandra</i>	23
Figura 11 Estructuras químicas de los compuestos aislados de <i>A. aurantiaca</i>	23
Figura 12 Estructuras químicas de los compuestos aislados de <i>A. aurantiaca</i>	23
Figura 13 Diagrama de la estrategia experimental	27
Figura 14 Diagrama de la obtención de fracciones por partición con disolventes en gradiente de polaridad	38
Figura 15 Diagrama de purificación del compuesto 1	40
Figura 16 Diagrama de purificación del compuesto 2	41
Figura 17 Diagrama de purificación del compuesto 3	43
Figura 18 Diagrama de purificación del compuesto 4	44
Figura 19 Diagrama de purificación del compuesto 5	45

Figura 20	Perfiles cromatográficos del extracto metanólico y fracciones de <i>A. scabra</i>	46
Figura 21	Perfil cromatográfico de las fracciones resultantes de la CLV de la fracción hexánica	47
Figura 22	Estructura química del escualeno	47
Figura 23	Cromatograma de gases del compuesto 1	48
Figura 24	Espectro de masas del compuesto 1	49
Figura 25	Perfil cromatográfico de las fracciones resultantes de la CLV de la fracción diclorometánica	50
Figura 26	Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 2 con la estructura de cirsimaritina indicando los protones de las señales observadas	51
Figura 27	Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto 2 con la estructura de la cirsimaritina indicando los carbonos de las señales observadas	52
Figura 28	Espectro de IR del compuesto 2 indicando las señales más importantes	52
Figura 29	Estructura del compuesto cirsimaritina	53
Figura 30	Perfil cromatográfico de las fracciones resultantes de la CLV de acetato de etilo	54
Figura 31	Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 3 con la estructura de la cirsimarina indicando los protones de las señales observadas	55
Figura 32	Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto 3 con la estructura de la cirsimarina indicando los carbonos de las señales observadas	56
Figura 33	Espectro de IR del compuesto cirsimarina indicando las señales más importantes	56
Figura 34	Estructura del compuesto cirsimarina	57
Figura 35	Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 4 con la estructura del sorbifolín indicando los protones de las señales observadas	59
Figura 36	Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto 4 con la estructura del sorbifolín indicando los carbonos de las señales observadas	60
Figura 37	Espectro de IR del compuesto sorbifolín indicando las señales más importantes	59
Figura 38	Estructura del compuesto sorbifolín	61

Figura 39	Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 5 con la estructura del sorbifolín-6-O-β-glucopiranosido indicando los protones de las señales observadas	62
Figura 40	Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto 5 con la estructura del sorbifolín-6-O-β-glucopiranosido indicando los carbonos de las señales observadas	63
Figura 41	Espectro de IR del compuesto sorbifolín-6-O-β-glucopiranosido indicando las señales más importantes	63
Figura 42	Estructura del compuesto sorbifolín-6-O-β-glucopiranosido	64
Figura 43	Grupos funcionales de los flavonoides que influyen en la actividad antioxidante	75

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1 Drogas activas contra la infección por <i>G. lamblia</i> , mecanismo de acción, dosis recomendadas y efectos secundarios	7
Cuadro 2 Pesos y rendimientos del extracto y fracciones de <i>Aphelandra scabra</i>	46
Cuadro 3 Métodos de separación y cantidad de cirsimarina aislada a partir de las fracciones resultantes de la purificación por CLV de la fracción diclorometánica	50
Cuadro 4 Comparación de los desplazamientos del espectro de RMN- ¹ H (400 MHz) del compuesto 2 y de cirsimarina en DMSO	53
Cuadro 5 Comparación de los desplazamientos del espectro de RMN- ¹ H (400MHz) del compuesto 3 y de cirsimarina en DMSO	57
Cuadro 6 Comparación de los desplazamientos del espectro de RMN- ¹ H del compuesto 4 y de sorbifolín en DMSO	60
Cuadro 7 Actividad anti-giardiasica del extracto metanólico y fracciones resultantes de la partición con disolventes en gradiente de polaridad	72
Cuadro 8 Actividad anti-giardiasica de las fracciones resultantes de la CLV de la partición diclorometánica	73
Cuadro 9 Actividad anti-giardiasica <i>in vitro</i> de los metabolitos aislados	74

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue aislar y purificar metabolitos secundarios responsables de la actividad anti*giardiásica* presentada por el extracto metanólico de hojas de *Aphelandra scabra* (Acanthaceae). Para esto, se utilizaron diversas técnicas cromatográficas en donde las fracciones obtenidas se sometieron al bioensayo de inhibición de crecimiento de *Giardia lamblia* para realizar un aislamiento biodirigido. Como resultado, se obtuvieron cinco compuestos. El compuesto **1**, identificado como escualeno mediante análisis de cromatografía de gases acoplado a masas, ha resultado con una $IC_{50} = 99.1 \mu\text{g/mL}$ la cual, según reportes de la literatura, es una actividad considerada baja. El compuesto **2**, se identificó como cirsimaritina de acuerdo a análisis espectroscópicos. Este flavonoide resultó con una elevada actividad en el bioensayo contra *G. lamblia*, presentando una $IC_{50} = 1.2 \mu\text{g/mL}$, considerándose sobresaliente en comparación con otros metabolitos anteriormente reportados en la literatura. Adicionalmente, se sometió a un bioensayo de citotoxicidad para descartar que la actividad presentada, se debiera a la toxicidad del metabolito. En dicho bioensayo, la cirsimaritina demostró ser no citotóxica a concentraciones hasta de $100 \mu\text{g/mL}$. El compuesto **3** fue identificado como cirsimarina de acuerdo a sus análisis espectroscópicos, y corresponde al glucósido del compuesto **2**. Tal metabolito no presentó actividad biológica contra *G. lamblia*, sugiriendo que el azúcar disminuye su actividad. El compuesto **4** fue elucidado como sorbifolín de acuerdo a estudios espectroscópicos y presentó una actividad moderada en el bioensayo de inhibición con una $IC_{50} = 22.7 \mu\text{g/mL}$. Por último, el compuesto **5** se identificó como sorbifolín 6-O- β -glucopiranosido de acuerdo al análisis espectroscópico de RMN, y corresponde al glucósido del compuesto **4**. Se concluye que los metabolitos cirsimaritina y sorbifolín son los responsables de la actividad *giadica* presentada por el extracto metanólico de hojas de *Aphelandra scabra*, siendo este trabajo el primero en realizar un estudio fitoquímico de dicha especie, por lo que los compuestos aislados se reportan como nuevos para el género y la especie.

ABSTRACT

The objective of this study was to isolate and purify the secondary metabolites responsible of the anti-giardia activity of methanol extract of *Aphelandra scabra* leaves (Acanthaceae). For this purpose, chromatographic techniques were used and the obtained fractions were tested to *Giardia lamblia* growth inhibition assay for assay-guided fractionation. As a result, five compound were isolated. Compound **1**, identified as squalene by gas chromatography-mass spectrometry, shows an $IC_{50} = 99.1 \mu\text{g/mL}$. Such activity is considered as low, according to the literature. Compound **2** was identified as cirsimaritin through spectroscopic analyses. This flavonoid displayed a high activity in the anti-giardia bioassay with an $IC_{50} = 1.2 \mu\text{g/mL}$, being considered as outstanding when compared to previous reported metabolites. This compound was also tested by cytotoxic bioassay in order to discard that the anti-giardia effects was due to cytotoxicity. In this bioassay, cirsimaritin proved to be not cytotoxic at concentrations below $100 \mu\text{g/mL}$. Compound **3** was identified as cirsimarin by spectroscopic analysis, corresponding to the glycoside of compound **2**. This metabolite was inactive, suggesting that the glycosyl moiety inhibits the biological activity of this flavonoid. Compound **4** was identified as sorbifolin in accordance to spectroscopic analysis and displayed a moderate activity, showing an $IC_{50} = 22.7 \mu\text{g/mL}$. Finally, compound **5** was identified as sorbifolin 6-O- β -glucopiranoside by spectroscopic analysis and corresponding to the glucoside of compound **4**. In conclusion, we suggest that cirsimaritin and sorbifolin are the metabolites responsible for the anti-giardia activity exhibited by the methanol extract of *A. scabra* leaves, being the present study the first report on the phytochemistry of this species, thus the isolated compounds are considered as new for the genus and the species.

CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

1. INTRODUCCIÓN

La giardiasis es la enfermedad parasitaria más común en el mundo, constituyendo un problema de salud pública especialmente en países en desarrollo (Vázquez-Tsuji y Campos-Rivera, 2009).

En la República Mexicana, las parasitosis intestinales son una de las primeras causas de morbilidad (Sánchez-Vega *et al.*, 2000). En el año 2010 fueron reportados 20,599 casos de giardiasis según el Sistema Nacional para la Vigilancia Epidemiológica, siendo los estados de Chiapas, Estado de México, Sinaloa, Veracruz, Yucatán y el Distrito Federal los que mostraron mayor número de casos acumulados (SINAVE, 2011).

Los principales síntomas de esta enfermedad son: diarreas que van desde agudas hasta crónicas, fiebre, distensión abdominal y heces explosivas. Tiene varias formas clínicas de presentación: asintomática, síndrome diarreico agudo y crónico, dolor abdominal recurrente, síndrome dispéptico y síndrome de malabsorción con desnutrición proteico-energética (Alonso-Carbonell, 2010). En los infantes los síntomas están asociados a desnutrición, deficiencia de micronutrientes, incapacidad de mejorar, anemia ferropénica y función cognitiva deficiente (Hesham *et al.*, 2004; Berkman *et al.*, 2002).

El tratamiento farmacológico de la giardiasis consiste en la administración de nitroimidazoles como: metronidazol, tinidazol, secnidazol y ornidazol, además de otros fármacos de la familia de los bencimidazoles, paromomicina, furazolidona y nitazoxanida. Sin embargo, se ha reportado una amplia variedad de efectos secundarios tales como: dolor de cabeza, náuseas, vómito, vértigo, sabor metálico en la boca, leucopenia, mareo, urticaria y prurito, entre otros. Dichas reacciones adversas ocasionan el abandono del tratamiento o bien la resistencia del parásito (Gupta *et al.*, 2004; Mineno y Avery, 2003; Rivera *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 2001). Por lo anterior, es importante la búsqueda de nuevos, seguros y efectivos agentes contra *G. lamblia* a partir de otras fuentes (Peraza-Sánchez *et al.*, 2005).

El uso popular de las plantas en el tratamiento de parasitosis intestinales, especialmente giardiasis, junto con los efectos secundarios de los fármacos que normalmente son empleados para tratarla, han estimulado la investigación de productos naturales con el

propósito de validar las propiedades anti-giardíasicas atribuidas empíricamente y desarrollar la posibilidad de nuevas terapias alternativas (Amaral *et al.*, 2006).

2. ANTECEDENTES

2.1 GIARDIASIS

La giardiasis es una enfermedad infecciosa del intestino producida por el parásito flagelado *Giardia lamblia* (sin. *G. intestinalis*, *G. duodenalis*). Es de distribución universal y afecta preferentemente a los niños, con una elevada tasa de portadores asintomáticos (Alonso-Carbonell, 2010). Esta infección se contrae al ingerir alimentos o agua contaminada con los quistes de *Giardia* (forma infectante) y por vía directa de persona a persona (Phillips-Ellis *et al.*, 2010). Bajos niveles de educación, higiene reducida y agua contaminada están relacionados con los altos porcentajes de prevalencia de esta infección (Quihui *et al.*, 2010; Mineno y Avery, 2003).

Los principales síntomas de esta enfermedad incluyen diarrea, dolor abdominal y pérdida de peso (Andersen *et al.*, 2006), mientras que en infantes se ha reportado síntomas tales como náuseas, mala absorción de lactosa, carbohidratos, grasas y vitaminas A y B12, así como anemia y retardo en el crecimiento y desarrollo (Prado *et al.*, 2003).

Para el año 2006 cerca de 200 millones de personas en Asia, África y Latinoamérica presentaban síntomas de infección intestinal por *G. lamblia* y se estima que hay 280 millones de nuevos casos por año a nivel mundial (Lane y Lloyd, 2002).

La frecuencia de la parasitosis en México es muy variable, con cifras que fluctúan del 2 al 39%. Un estudio que reunió 37 trabajos realizados en 14 estados de la República Mexicana, mostró una prevalencia del 18.98%, presentándose la mayor parte de ellos en preescolares y escolares (Vásquez-Tsuji y Campos-Rivera, 2009).

2.2 GIARDIA LAMBLIA

Giardia lamblia es un protozoo flagelado con doble núcleo celular que causa infección intestinal en mamíferos, aves, reptiles y anfibios. Fue descrito por Leewenhoek en 1681 y posteriormente, a gran detalle por Lambl en 1859. En 1882 y 1883 Kunstler describió un organismo como renacuajo al que nombró *Giardia*, siendo este nombre usado por primera vez como género. En 1888, Blanchard sugirió el nombre *Lamblia intestinalis*, que Stiles

cambió a *G. duodenalis* en 1902. Después, Kafoid y Christiansen propusieron el nombre de *G. lamblia*. (Adam, 2001)

El parásito adopta dos formas: trofozoítos y quistes (Figura 1). El trofozoíto es una célula en forma de pera de 12-15 μm de largo, 5-7 μm de ancho y 1-2 μm de espesor. Tiene un complejo citoesqueleto que mantiene la forma del parásito y sostiene los cuatro pares de flagelos, cuerpos medios y el disco ventral. Estas estructuras son importantes para la unión de los trofozoítos a la mucosa intestinal (Ankarklev, 2010).

Los quistes de *G. lamblia* son de forma oval y su tamaño va de 6 a 10 μm (Adam, 2001; Carranza y Luján, 2010). En la fase de quiste, el organismo es relativamente resistente a la cloración y ozonólisis, y puede permanecer viable por varias semanas, especialmente, en la superficie del agua (Ali y Hill, 2003).

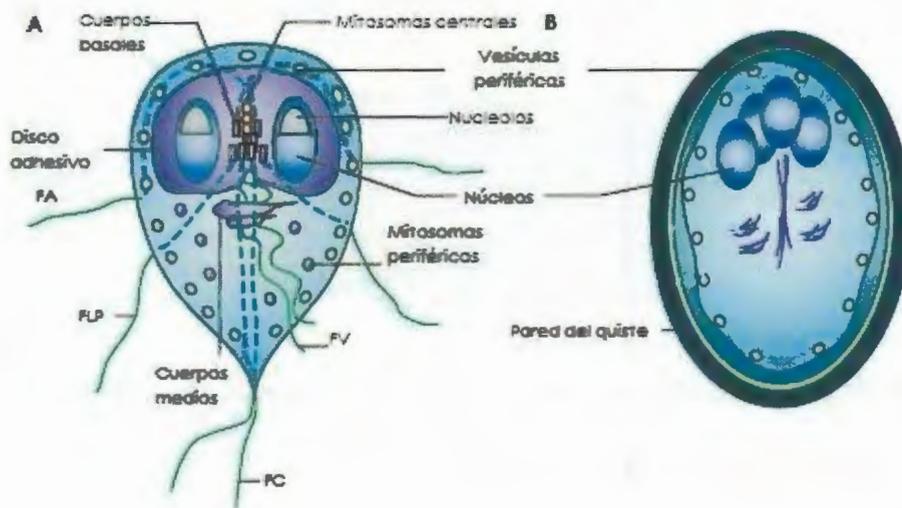


Figura 1. Diagrama de *Giardia lamblia*. A. Trofozoíto. B. Quiste (modificado de Ankarklev, 2010).

2.2.1 CICLO VITAL DE GIARDIA LAMBLIA

La infección ocurre al ingerir los quistes (Figura 2). La dosis infectante oscila de 1 a 10 quistes. En el intestino delgado ocurre el desenquistamiento, el cual se inicia en el estómago y termina en el duodeno bajo la influencia de las secreciones pancreáticas. De cada quiste se producen dos trofozoítos hijos, los cuales viven en las vellosidades intestinales, colonizando el duodeno y el yeyuno. Los trofozoítos se reproducen de

inmediato por fisión binaria hasta alcanzar un enorme número. Se fijan a la mucosa, y si las condiciones son adversas se enquistan nuevamente y se excretan con las heces (Rivera, 2002; Katerlaris y Farthing, 1992).

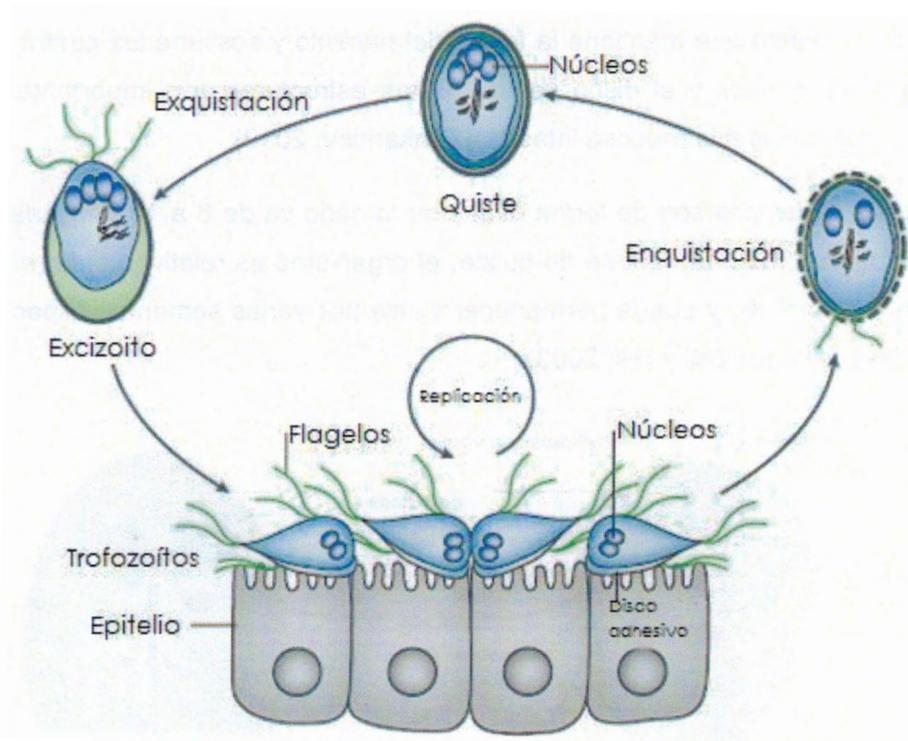


Figura 2. Ciclo biológico de *Giardia lamblia* (modificado de Ankarklev, 2010).

2.3 TRATAMIENTO DE LA GIARDIASIS

Se han utilizado muchos fármacos en el tratamiento de esta enfermedad, usualmente de la familia de los nitroimidazoles, bencimidazoles, paromomicina o furazolidona, además de nitazoxanida, cuyos puntos principales se describen en el Cuadro 1.

2.3.1 NITROIMIDAZOLES

Los nitroimidazoles usados para tratar *G. lamblia* incluyen fármacos como: metronidazol, tinidazol, ornidazol y secnidazol.

Cuadro 1. Drogas activas contra la infección por *G. lamblia*, mecanismo de acción, dosis recomendadas y efectos secundarios (Mørch, 2010).

Droga	Mecanismo	Efectos Secundarios	Dosis Recomendadas	
			Adultos	Niños
Nitroimidazoles				
<i>Metronidazol</i>	Se unen al ADN	Sabor metálico, reacción disulfiram,	200 mg 3 veces × 7d	15-20 mg/Kg
	Producen radicales tóxicos	dolor de cabeza, vértigo, insomnio, irritabilidad,	500 mg	3 dosis × 7 d
	Inhiben la respiración del trofozoito	neuropatías, calambres,	1 vez × 10 d	25 mg/Kg
<i>Tinidazol</i>		erupciones, orina oscura, leucopenia, pancreatitis, hepatitis.	500 mg 3 veces × 5 d	3 dosis × 5 d
<i>Ornidazol</i>			1.5-2 g 1 dosis	50 mg/Kg
<i>Secnidazol</i>			1-2 g 1 dosis	1 dosis
			2 g 1 dosis	30 mg/Kg
				1 dosis
Bencimidazoles				
<i>Albendazol</i>	Inhiben la polimerización del citoesqueleto e impide el consumo de glucosa uniéndose al citoesqueleto de β-tubulina	Náusea, vómito, diarrea, dolor epigástrico.	400 mg	10 mg/Kg
			1 vez × 5 d	1 vez × 5 d
<i>Mebendazol</i>		Dolor abdominal transitorio.	100-200 mg 1-2 veces × 5 d	
Derivados de acridina				
<i>Quinacrina</i>	Posible inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos por unión al ADN o reducción del consumo de oxígeno por interferencia con la NADH oxidasa.	Vómito, sabor amargo, náuseas, dolor de cabeza, decoloración de la piel, urticaria, dermatitis, exacerbación de psoriasis y psicosis.	100 mg	8 mg/Kg
			3 veces × 5 d	3 dosis × 5 d
Derivados de nitrofurano				
<i>Furazolidona</i>	Posible activación reductiva por la enzima NADH oxidasa y producción de radicales nitro tóxicos que dañan los organelos del parásito incluyendo su ADN.	Náusea, vómito, diarrea. Anemia hemolítica en neonatos. Reacción de disulfiram. Orina oscura.	100 mg	6 mg/Kg
			4 veces × 10 d	4 dosis × 10 d

Continuación Cuadro 1.

Aminoglicósidos					
<i>Paromomicina</i>	Su interacción con las unidades ribosomales 50S y 30S conduce a un marco de lectura alterado, inhibiendo la síntesis de proteínas.	Usualmente bien tolerada. Malestar gastrointestinal.	500 mg 3 veces × 10 d	25 mg/Kg en 3 dosis × 10 d	
Derivados del 5-nitrotiazol					
<i>Nitazoxanida</i>	No entendido completamente. Efecto antiparasítico después de activación reductiva. Inhibe la nitrorreductasa G1NR-1 del parásito.	Usualmente bien tolerada. Dolor abdominal, diarrea, vómito, dolor de cabeza, orina amarillenta-oscura.	500 mg 2 veces × 3 d	7.5 mg/Kg en 2 dosis × 3 d	

El tratamiento actual para la infección por *G. lamblia* está basado en metronidazol (Figura 3A), un nitroimidazol citotóxico que induce desagradables reacciones secundarias como dolor de cabeza, desórdenes gastrointestinales y reacciones de hipersensibilidad según el U.S. National Institutes of Health. En *G. lamblia* el metronidazol actúa como un aceptor de electrones, y su reducción en el metabolismo anaeróbico promueve daños a nivel de ADN, provocando su segregación así como su división (Hausen *et al.*, 2010).

Las dosis empleadas en el tratamiento de esta enfermedad van de dos a tres veces diarias (generalmente 250 mg/dosis) por cinco a diez días y una terapia corta (de uno a 3 días) con una sola dosis diaria (2.0-2.4 g/dosis). En las anteriores profilaxis los rangos de eficacia van del 60 al 100% en pacientes adultos y pediátricos (Gardner y Hill, 2001).

Dentro de los efectos secundarios podemos encontrar: vómito, debilidad, mareos, dolor de cabeza, náuseas y sabor metálico en la boca (Gardner y Hill, 2001; Jokipii y Jokipii, 1979). Además, han sido reportadas cepas de *G. lamblia* resistentes al metronidazol, debido al abandono del tratamiento o subdosificación al presentarse los efectos secundarios (Mineno y Avery, 2003).

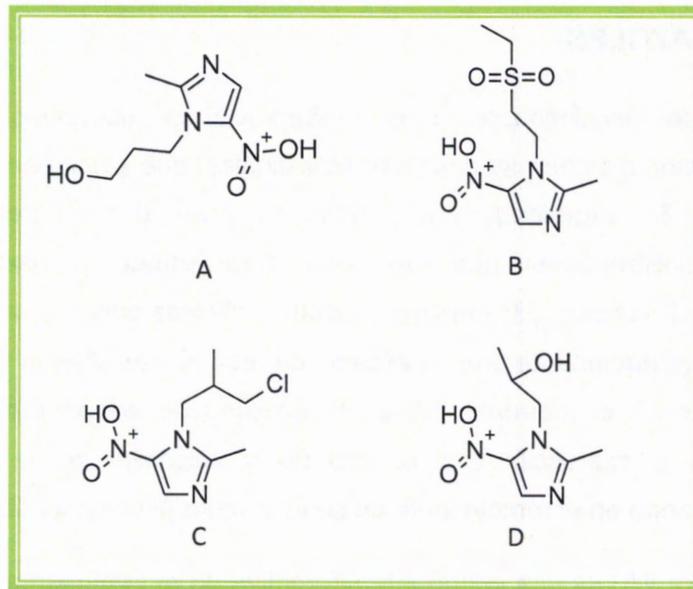


Figura 3. Estructura química de los fármacos de la familia de los nitroimidazoles. A. metronidazol, B. tinidazol, C. secnidazol y D. ornidazol.

El tinidazol (Figura 3B) es uno de los dos únicos fármacos aprobados por la FDA como terapia contra la giardiasis, además de que se ha demostrado que posee actividad sobre quistes de *G. lamblia* (Krishnamurthy, 1978). Los principales efectos secundarios son sabor metálico, náuseas, vómito y reacción disulfiram con alcohol (Petri, 2005).

En cuanto al secnidazol (Figura 3C), sus propiedades son similares a las de las otras drogas de su grupo, pero con un mayor tiempo de vida media en plasma. Algunos autores plantean que este medicamento presenta una actividad citolítica, que se ejerce por un cambio de la información genética del ADN por medio de la reducción del grupo nitro, pero hasta el momento, el mecanismo a través del cual ejerce su acción antiparasitaria no ha sido dilucidado totalmente (Moya-Mirabal *et al.*, 2003). El secnidazol demostró ser efectivo (95%) en una sola dosis (30 mg/Kg peso) durante un estudio realizado en niños de Venezuela, sin embargo, se reportan efectos secundarios que incluyen dolor abdominal, diarrea y flatulencia (Di Prisco *et al.*, 2000).

De acuerdo a diversas pruebas clínicas el ornidazol (Figura 3D) ha demostrado ser muy efectivo, obteniéndose una tasa de curación de 93.6% (Bussati *et al.*, 2010). Posee una vida media en plasma e hígado más larga que el metronidazol. Tiene menos efectos secundarios y es recetado en dosis de 40 mg/Kg en una sola dosis durante tres días (Gupta *et al.*, 2004).

2.3.2 BENCIMIDAZOLES

Los carbamatos de bencimidazol como mebendazol o albendazol, cambiaron el tratamiento convencional de nemátodos gastrointestinales, que afectaban a un tercio de la población mundial. Su seguridad, amplio espectro y en el caso del albendazol, la posibilidad de administrarlos en una sola dosis, hizo tentador probarlos contra otros protozoarios como *G. lamblia*. Sin embargo, estudios clínicos comprobaron que una sola dosis no era efectiva, además de que, la eficacia de ambas iba del 62 a 95%, comparada con el 97% que posee el metronidazol. El mecanismo de acción propuesto para los bencimidazoles, es la interacción con el sitio de la colchicina en la tubulina de los microtúbulos, resultando en el rompimiento de su estructura (Rossignol, 2010).

El albendazol (Figura 4A) es una importante alternativa en el tratamiento de la giardiasis. *In vitro*, el albendazol inhibe el crecimiento de los trofozoítos de *G. lamblia* y su adhesión a células del epitelio gastrointestinal, e interrumpe la actividad de los microtúbulos en el disco adhesivo del trofozoíto (Karabay *et al.*, 2004).

En 1991 se probó la susceptibilidad de *G. lamblia* contra los bencimidazoles albendazol y mebendazol, en donde el primero, fue el compuesto más activo con una IC_{50} de 0.01 $\mu\text{g/mL}$ (Cedillo-Rivera y Muñoz, 1992). Su efectividad, cuando es administrado en una sola dosis de 400 mg al día, por 5 días, fue comparable a la del metronidazol. En lo que corresponde a los efectos secundarios, en los pacientes tratados con albendazol se presentaron con menor frecuencia que en aquellos que tomaron metronidazol (Solaymani-Mohammadi *et al.*, 2010).

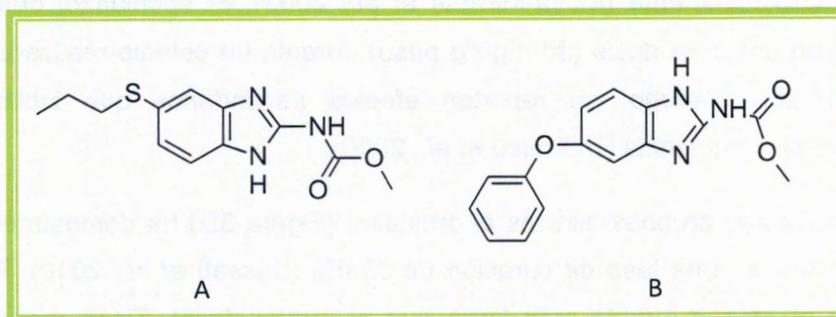


Figura 4. Estructura química de los fármacos de la familia de los bencimidazoles. A. albendazol. B. mebendazol.

Los estudios *in vitro* llevados a cabo en los noventas, demostraron que el mebendazol (Figura 4B) y el albendazol afectaban el crecimiento de *G. lamblia*, induciendo el desprendimiento de los trofozoítos y alterando la morfología y estructura por acción anti-microtúbulos, lo que hizo necesario la realización de análisis *in vivo*. Sin embargo, éstos resultaron contradictorios. Una revisión acerca del mebendazol, elaborada por Cañete *et al.* (2009), muestra diversos esquemas de administración, en donde se reportan porcentajes de eficiencia que van del 14.5 al 95.0%, y señala que debe ser considerado como una alternativa cuando los fármacos de primera línea han fallado o no han sido bien tolerados.

Como se indica en el estudio ya mencionado, debido a la pobre absorción del mebendazol, sus efectos secundarios incluyen: trastornos gastrointestinales menores como dolor abdominal y diarrea, así como dolor de cabeza y mareo, que han sido reportados ocasionalmente.

2.3.3 QUINACRINA

Derivada de la acridina, la quinacrina (Figura 5A) fue durante mucho tiempo considerada el tratamiento de elección, pero efectos secundarios tales como psicosis y hemólisis ocurrían a pacientes con deficiencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Ortega y Adam, 1997). Actualmente la FDA ha listado varias consecuencias asociadas al uso de la quinacrina en las que se incluyen: aumento del riesgo de cáncer de conductos reproductivos, desarrollo de lesiones uterinas, embarazo ectópico, amenorrea prolongada y exposición fetal (Mineno y Avery, 2003).

2.3.4 FURAZOLIDONA

La furazolidona (Figura 5B), derivada del nitrofurano y conocida comercialmente como Furoxona®, ha mostrado ser efectiva tanto *in vitro* como *in vivo*. Es selectiva para protozoos ya que es activada mediante los mismos parásitos (Harris *et al.*, 2001). Su posible mecanismo de acción es la producción de radicales nitro tóxicos que dañan los organelos funcionales de los parásitos incluyendo su ADN. Dentro de sus efectos secundarios se citan náuseas, vómito, diarrea, anemia hemolítica en neonatos, reacción disulfiram y orina oscura (Mørch, 2010).

2.3.5 PAROMOMICINA

Paromomicina (Figura 5C) es un miembro de la familia de los aminoglicósidos y la droga de elección para el tratamiento de giardiasis en mujeres embarazadas, con una dosis de 500 mg tres veces al día durante 5-10 días. Se absorbe pobremente por el intestino y se excreta prácticamente sin metabolizar (Farthing, 2006). Su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de proteínas de *G. lamblia* interfiriendo en las subunidades ribosomales 50S y 30S, causando un desfase en el marco de lectura de los codones de ARNm. Debe ser usado con precaución por las personas con problemas en la función renal (Gardner y Hill, 2001).

2.3.6 NITAZOXANIDA

La nitazoxanida (Figura 5D) es un compuesto de tipo nitrotiazoil benzamida relativamente nuevo. Es una droga antiparasítica de amplio espectro que ha probado ser efectivo contra protozoos, helmintos y algunas bacterias aunque ha mostrado eficacia limitada en adultos y niños de México (Escobedo *et al.*, 2008; Rossignol *et al.*, 2001; Romero-Cabello *et al.*, 1997). Usualmente es bien tolerado, aunque en algunos pacientes se han presentado síntomas como: dolor abdominal, diarrea, vómito y dolor de cabeza (Mørch, 2010).

Debido a la ocurrencia de diversos efectos secundarios y al incremento de la resistencia del parásito a los fármacos sintéticos anteriormente descritos, ha habido un creciente interés en la búsqueda de alternativas naturales para el control de esta enfermedad. Actualmente, los investigadores han puesto la vista sobre plantas que han sido usadas como remedio para malestares gastrointestinales por personas que practican la medicina alternativa desde generaciones atrás (Harris *et al.*, 2001).

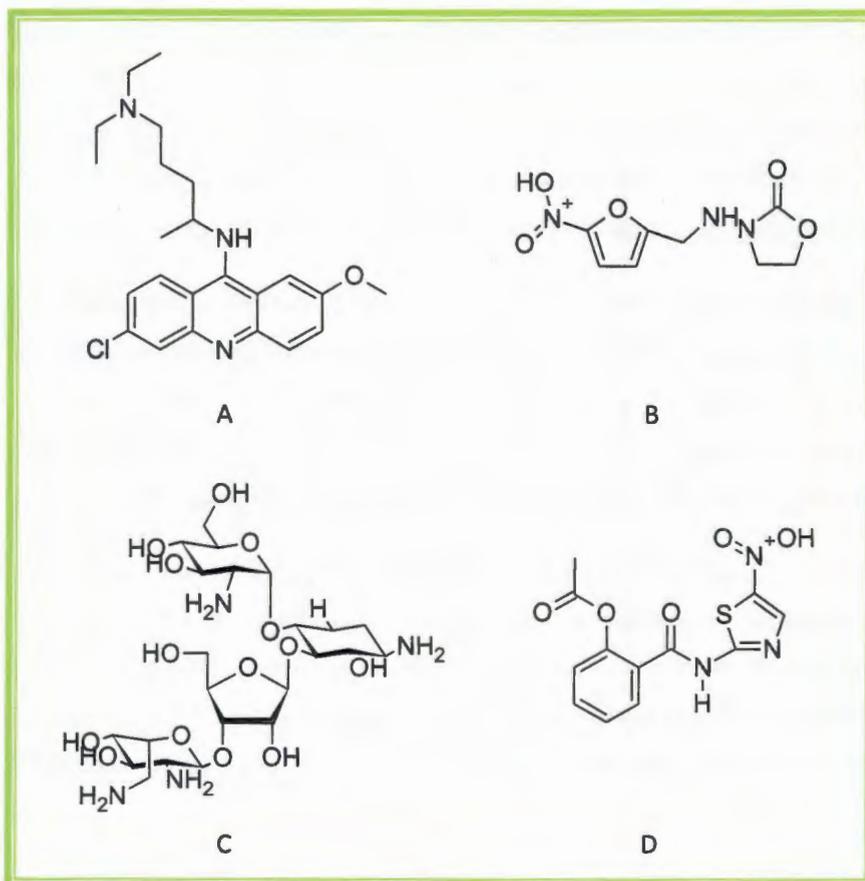


Figura 5. Estructura química de otros fármacos empleados en el tratamiento de *G. lamblia*. A. Quinacrina. B. Furazolidona. C. Paromomicina. D. Nitazoxanida.

2.4 ACTIVIDAD ANTIGIARDIÁSICA DE EXTRACTOS VEGETALES

Recientemente ha habido un renovado interés en la investigación de productos naturales debido al fracaso que han tenido los métodos alternativos de descubrimiento de drogas como fuente de compuestos líderes en áreas como las enfermedades infecciosas (Butler, 2004). Dentro de estas investigaciones los estudios etnobotánicos y etnofarmacológicos han arrojado una variedad de plantas utilizadas para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, como diarrea y disentería, causada en algunos casos por *G. lamblia*. Además, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente el 80% de la población mundial hace uso de remedios tradicionales para el cuidado de la salud (Costa-Brandelli *et al.*, 2009).

El uso popular de las plantas en el tratamiento de la parasitosis intestinal, especialmente giardiasis, junto con los efectos secundarios de los fármacos que normalmente son empleados con este fin, han estimulado la investigación de productos naturales con el propósito de validar las propiedades anti-giardíasicas atribuidas empíricamente y desarrollar la posibilidad de nuevas terapias alternativas (Amaral *et al.*, 2006).

Dentro de los primeros estudios realizados en plantas con actividad anti-giardíasica, se encuentra el de Johns *et al.* (1995), donde los autores investigaron la actividad de treinta y seis especies de plantas utilizadas por la población para aliviar trastornos gastrointestinales, en la región de Luo, África del Este. Se encontró que al menos 22 de los extractos causaron letalidad o inhibición del crecimiento de trofozoítos de *G. lamblia*.

Sawangjaroen *et al.* (2005) evaluaron la actividad de los extractos de cloroformo, metanol y agua, de 12 especies vegetales que se usan comúnmente en los pacientes de SIDA para tratar la giardiasis, en el sur de Tailandia. Como resultado, el extracto de cloroformo de *Alpinia galanga* exhibió la mayor actividad con una IC_{50} de 37.73 $\mu\text{g/mL}$, además se obtuvieron otros cinco extractos de cloroformo con $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$, clasificados como activos.

Recientemente, se llevó a cabo un escrutinio de doce plantas usadas para tratar síntomas como diarrea y cólicos, en un poblado de Camerún, África. Los resultados revelaron que después de 72 horas de incubación, *Phoenix reclinata* y *Solanocia mannii* fueron las mejores candidatas para su posterior estudio, con $MIC = 100 \mu\text{g/mL}$ (Hubert, *et al.*, 2012).

Entre los países con mayor aportación a la investigación de productos naturales con actividad anti-giardíasica se encuentra México, en donde se han llevado a cabo estudios en un gran número de plantas que habían sido reportadas por su uso en el tratamiento de padecimientos gastrointestinales (Amaral *et al.*, 2006).

Para investigar la actividad anti-giardíasica de plantas utilizadas en México como antidiarreicas o antiparasitarias, se evaluaron *in vitro* catorce especies vegetales. Se observó un alto porcentaje de inhibición en nueve plantas, resultando con mayor actividad: *Justicia spicigera* (91%), *Lippia berlandieri* (90%) y *Psidium guajava* (87%) (Ponce-Macotella *et al.*, 1994).

Como parte de un estudio realizado en la península de Yucatán, fueron evaluadas contra *G. lamblia* 48 plantas usadas en la medicina tradicional maya a través de sus extractos con disolventes polares y no polares, los cuales tuvieron valores de IC₅₀ menores a 90 µg/mL (Ankli *et al.*, 2002).

En otro estudio se analizaron las actividades de los extractos metanólicos de 10 plantas colectadas en la península de Yucatán, resultando con valores de IC₅₀ que van desde 6.34 a 117.41 µg/mL, siendo más activa la especie *Tridax procumbens* (6.34 µg/mL), seguida de *Cupania dentata* (7.59 µg/mL), *Diphysa carthagenensis* (11.53 µg/mL) y *Byrsonima crassifolia* (15.55 µg/mL) (Peraza-Sánchez *et al.*, 2005).

Por otra parte, en una investigación para buscar nuevas terapias contra protozoos gastrointestinales, se colectaron 26 plantas usadas en la medicina tradicional mexicana. Los extractos metanólicos se evaluaron contra *G. lamblia* en ensayos *in vitro*. Las especies *D. contrajerva*, *Senna villosa* y *Ruta chalepensis* mostraron mayor actividad con IC₅₀ < 38 µg/mL (Calzada *et al.*, 2006).

En un enfoque novedoso, se evaluaron 31 formulaciones (también conocidas como pociones), empleadas en la medicina tradicional maya, y que fueron preparadas con plantas de la región de acuerdo a datos etnobotánicos. En este trabajo de investigación, resultaron nueve formulaciones activas contra *G. lamblia*, con IC₅₀ < 20 µg/mL (Vera-Ku *et al.*, 2010).

Asimismo, algunos extractos vegetales han sido probados *in vivo* con promisorios resultados. Como ejemplo, se encuentran los extractos metanólicos de *Helianthemum glomeratum* y *Rubus coriifolius*, que mostraron una ED₅₀ de 0.12 y 0.50 respectivamente, al ser evaluados en ratones CD-1 infectados con *G. lamblia* (Barbosa *et al.*, 2006).

2.5 PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD ANTIGIARDIÁSICA

Los compuestos activos aislados e identificados en diferentes trabajos de investigación pertenecen a las clases de: flavonoides, triterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, entre otros (Figura 6).

Existen varios estudios realizados con flavonoides purificados a partir de plantas medicinales utilizadas en algunas regiones de México. Por ejemplo, Calzada *et al.* (2005a)

probaron la actividad anti-giardia de (-)-epicatequina y (+)-catequina obtenidas a partir de *Geranium mexicanum*, encontrando que la (-)-epicatequina es el compuesto con mayor actividad ya que posee una IC_{50} de 1.60 $\mu\text{g/mL}$. Asimismo, probando *in vitro* la actividad anti-giardia de los compuestos aislados de *Rubus coriifolius*, se reportó que el principal compuesto responsable de dicha actividad fue también la (-)-epicatequina, cuya actividad fue comparable a la de la emetina, pero no mejor que la del metronidazol (Alanís *et al.*, 2003).

De igual manera, formononetina, una isoflavona aislada de *Dalbergia frutescens*, exhibió una actividad mayor que la del metronidazol, reportando una $IC_{50} = 0.03 \mu\text{g/mL}$ en bioensayos *in vitro*. Junto con este compuesto, se aislaron otras dos isoflavonas: pseudobaptogenina y fujikinetina, las cuales tuvieron valores de $IC_{50} < 2 \mu\text{g/mL}$ (Khan *et al.*, 2000).

En otro estudio que se llevó a cabo en 2010, se encontró que la isoflavona formononetin inhibe la adhesión y la motilidad flagelar en minutos y reduce la carga de trofozoítos de *G. lamblia* en ratones, dentro de 1.5 h después del tratamiento (Lauwaet *et al.*, 2010).

Entre los estudios *in vivo*, se han evaluado los flavonoides kaempferol, tilirósido y (-)-epicatequina, aislados de *Geranium mexicanum*, *Cuphea pinetorum*, *Helianthemum glomeratum* y *Rubus coriifolius*. Dichos compuestos han mostrado una ED_{50} ($\mu\text{Mol/kg}$) de 0.07 para la epicatequina, 2.05 para kaempferol y 1.43 para tilirósido, en ratones CD-1 (Calzada *et al.*, 2007).

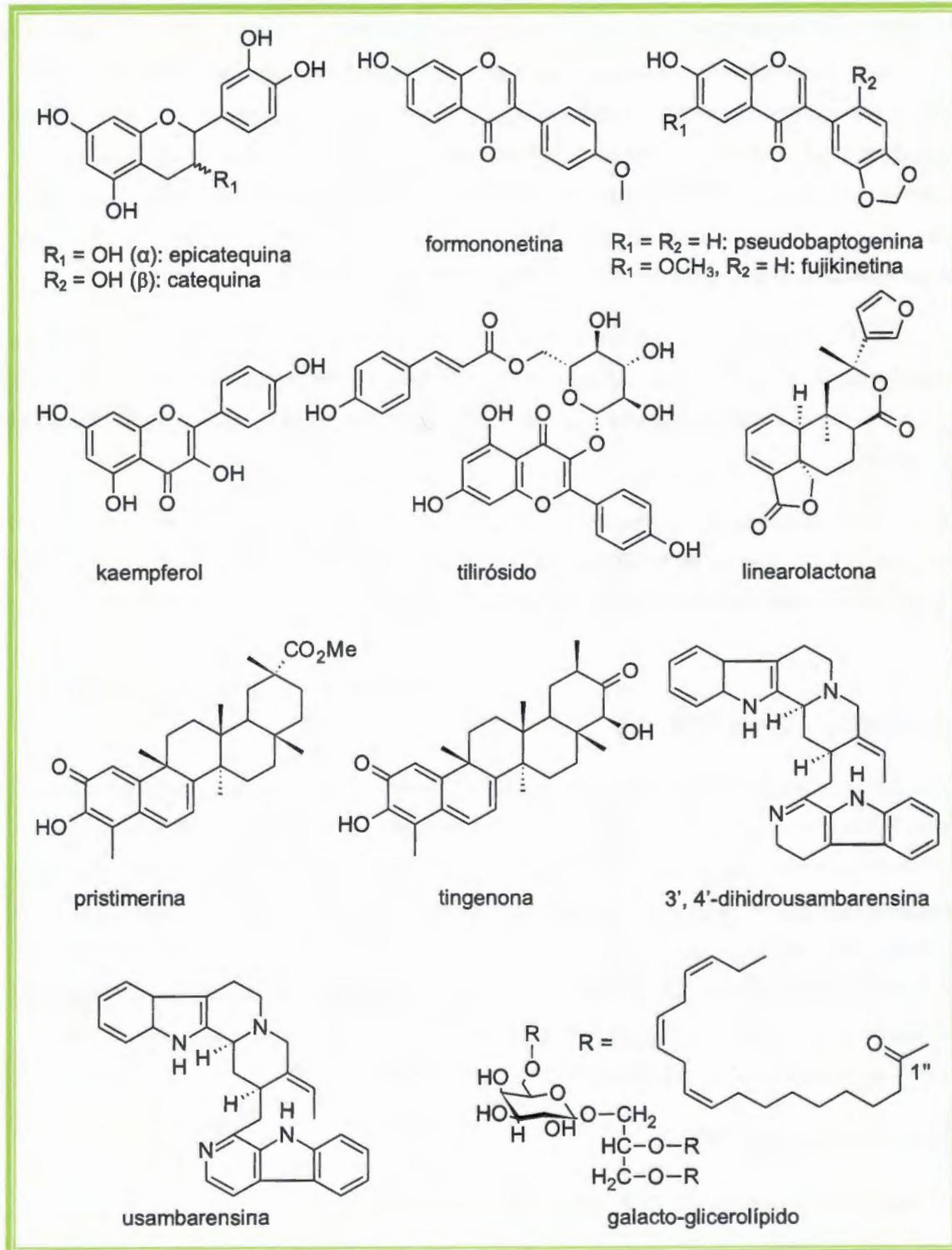


Figura 6. Estructuras químicas de productos naturales con actividad antiobesidad.

En 2007, una investigación dio como resultado el aislamiento de varios triterpenoides, de los cuales pristimerina y tingenona revelaron una importante actividad contra *G. lamblia*, siendo sus concentraciones inhibitorias de 0.11 μM y 0.74 μM , respectivamente, dichas actividades superan al metronidazol, sin embargo, poseen una restricción para su uso como antiparasíticos debido a su citotoxicidad (Mena-Rejón *et al.*, 2007). En cuanto a los diterpenos, la linearolactona, aislada de *Salvia polystachya*, obtuvo una $\text{IC}_{50} = 28.20 \mu\text{M}$, al ser evaluada *in vitro* contra trofozoítos de *G. lamblia* (Calzada *et al.*, 2010).

La 3',4'-dihidrousambarensina, un alcaloide, fue aislada de la especie *Strychnos usambarensis* al igual que la usambarensina, las cuales reflejaron una buena actividad contra *G. lamblia* mostrando una IC_{50} de 3.89 y 5.14 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Wright *et al.*, 1994).

Un compuesto novedoso, galacto-glicerolípido, fue aislado a partir de *Oxalis corniculata*, una planta utilizada en la medicina tradicional de India. Dicho compuesto observó una concentración inhibitoria *in vitro* de 3.70 $\mu\text{g/mL}$ (Manna *et al.*, 2010).

2.6 APHELANDRA SCABRA

Una de las plantas empleadas en la medicina tradicional en diversas comunidades del continente americano es *A. scabra*. Esta especie fue sometida a un bioensayo contra *Leishmania mexicana* de acuerdo al reporte de Peraza-Sánchez *et al.* (2007), en donde presentó una $\text{IC}_{50} = 15 \mu\text{g/mL}$. Tal actividad es considerada como buena para un extracto vegetal y debido a que ha demostrado poseer la capacidad de inhibir el crecimiento del protozooario *L. mexicana*, se sugiere en el presente estudio que podría exhibir actividad biológica contra otro género de protozoarios como lo es *G. lamblia*, por lo que se seleccionó como objeto de estudio dicha especie vegetal.

2.6.1 GENERALIDADES

La clasificación taxonómica de *A. scabra* es la siguiente:

Reino: Plantae
Phylum: Tracheobionta
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Lamiales
Familia: Acanthaceae
Subfamilia: Acanthoideae
Tribu: Acantheae
Género: *Aphelandra*
Especie: *Aphelandra scabra* (Vahl) Sm.

Aphelandra scabra (Figura 7), es una hierba leñosa que puede llegar hasta los 2 m de altura. Las flores son rojas y tubulares; están subtendidas por brácteas verdes dentadas en el ápice, la corola mide aproximadamente 3 cm de largo; son bisexuales y las inflorescencias son espigas terminales. Florece a lo largo de todo el año. El fruto es en forma de espiga; maduro, es de color café y sus semillas caen. Sus hojas son simples, opuestas y subsésiles (el pecíolo es muy corto dando la impresión que la lámina sale directamente del tallo), ambas superficies son tomentosas (cubiertas con pelos densos) y miden de 7-13 cm de largo. La corteza de *A. scabra* es de color café claro, lisa y con lenticelas visibles. La madera es blanca (Masís *et al.*, 1998).

En México se distribuye en los estados de Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz, mientras que, de manera general, habita en Centroamérica y el norte de Sudamérica (Flora digital: Península de Yucatán, 2010).

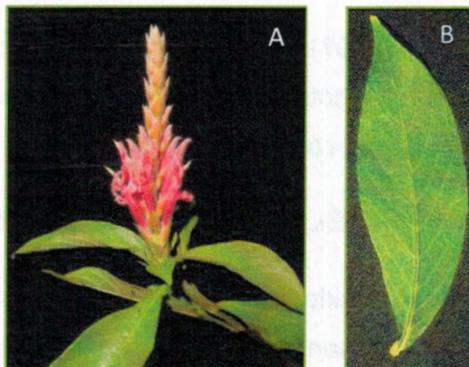


Figura 7. *A. scabra*. A. Inflorescencia. B. Hoja (Masís *et al.*, 1998).

Recibe varios nombres según la región donde se encuentre: en la comunidad Paya de Honduras se le conoce como *kuputí* (Lentz *et al.*, 1998), mientras que en la cultura maya *q'eqchi'* del sur de Belice es conocida como *sa'x jolom chacmut* o *sita pim* (Treyvaud-Amiguet *et al.*, 2005). En la lengua maya de Yucatán recibe el nombre de *chak anal*, *bisil k'aax* o *chak ts'its'iché* (Durán *et al.*, 2000).

Entre sus usos tradicionales en la comunidad Paya de Honduras, se cita que una bebida a base de raíces y hojas se emplea como carminativo (Lentz, 1993), en tanto la comunidad maya *q'eqchi'* hace amplio uso de esta planta como remedio en padecimientos del sistema circulatorio, infecciones, enfermedades mentales, del sistema nervioso y la piel, así como antídoto (Treyvaud-Amiguet *et al.*, 2005). De acuerdo a la Dirección de Conservación de la Biodiversidad de la Secretaría de Desarrollo Urbano y Medio Ambiente de Yucatán, *A. scabra* es usada con fines medicinales así como melíferos (SEDUMA, 2004).

Aphelandra scabra ha sido sometida a algunos bioensayos con el fin de validar sus propiedades medicinales; por ejemplo, Meurer-Grimes *et al.* (1996) investigaron el potencial antimicrobiano de hojas, tallo y raíz de esta planta contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, resultando activos los tres extractos en la inhibición de *S. aureus*.

En 1998 se realizaron nuevos estudios para investigar sus propiedades antimicrobianas, encontrándose una actividad buena contra *Bacillus subtilis* y una actividad media contra *S. aureus* y *P. aeruginosa* en el extracto etanólico de tallo y hojas de *A. scabra* (Lentz *et al.*, 1998). Peraza-Sánchez *et al.* (2007) probaron el extracto metanólico de las hojas de *A. scabra* en la inhibición de promastigotes de *Leishmania mexicana*, obteniendo una IC₅₀ de 15 µg/mL, una actividad promisorio contra este parásito.

2.6.2 ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL GENERO APHELANDRA

Debido a que *A. scabra* no ha sido estudiada fitoquímicamente, se describen a continuación los compuestos que han sido aislados de otras especies del género *Aphelandra*.

De las raíces de *A. squarrosa* se aislaron los alcaloides de tipo espermina aphelandrina (Figura 8A) y orantina (Figura 8B) (Dätwyler *et al.*, 1978). Posteriormente, en las raíces de *A. tetragona* se encontró aphelandrina y otros cinco alcaloides, dos de los cuales fueron identificados como 18-O-metilchaenorpina (Figura 8C) e *iso*-18-O-metilchaenorpina (Figura 8D) (Tawil *et al.*, 1989). En *A. fuscopunctata* se reportaron los compuestos aphelandrina, así como dos alcaloides de tipo espermina macrocíclicos denominados N(6)-hidroxi-aphelandrina (Figura 8E) y N(6)-acetoxi-aphelandrina (Figura 8F) aislados de sus raíces también (Youhnovsky *et al.*, 1999).

De la misma manera, han sido encontrados benzoxazinoides (Figura 9) como: 2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona (DIBOA), 2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona (DIMBOA), 2-hidroxi-1,4-benzoxazine-3(2*H*)-ona (HBOA), 2-hidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazine-3(2*H*)-ona (HMBOA) y sus correspondientes glucósidos así como las benzoxazolinonas BOA y MBOA en las raíces de *A. squarrosa* y *A. fuscopunctata* (Baumeler *et al.*, 2000). Asimismo, se aislaron tres cumaroil-espermidinas en las anteras de *A. tetragona* y *A. chamissoniana*, las cuales fueron identificadas como: N¹,N⁵-di-*p*-cumaroil-espermidina, N⁵,N¹⁰-di-*p*-cumaroil-espermidina y N¹,N⁵,N¹⁰tri-*p*-cumaroil-espermidina (Figura 10) (Werner *et al.*, 1995).

En 1994 se hizo una evaluación fitoquímica de hojas y tallos de *A. aurantiaca*, que comprendió el aislamiento e identificación de varios compuestos: una cumarina (escopoletina, Figura 11A) y cuatro flavonoides: crisina (Figura 11B), eucaliptina (Figura 11C), nevadensina (Figura 12A) y gnafalina (Figura 12B) y, así como ácido *p*-cumárico (Figura 12C), que se encontró como un éster de glucosa (Bratoeff y Pérez-Amador, 1994).

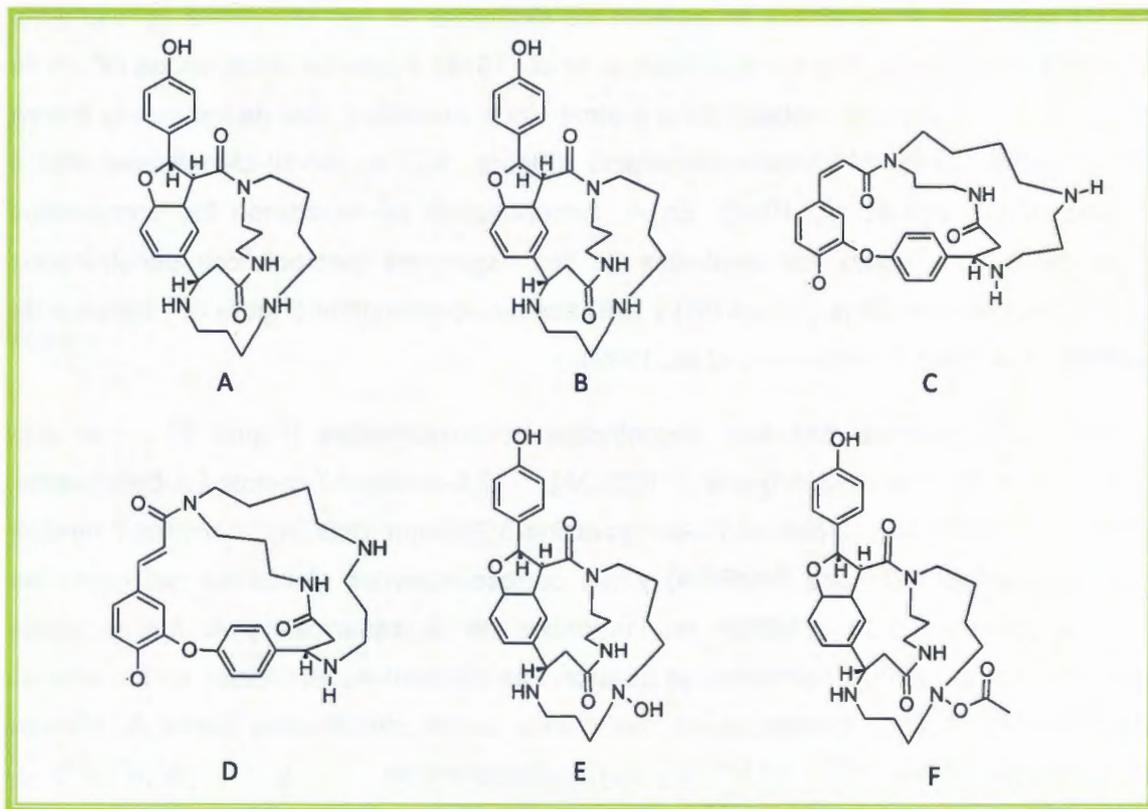


Figura 8. Estructuras químicas de los alcaloides de tipo espermina aislados del género *Aphelandra*. A. aphelandrina. B. orantina. C. 18-O-metilchaenorpina. D. iso-18-O-metilchaenorpina. E. N(6)-hidroxi-aphelandrina. F. N(6)-acetoxi-aphelandrina.

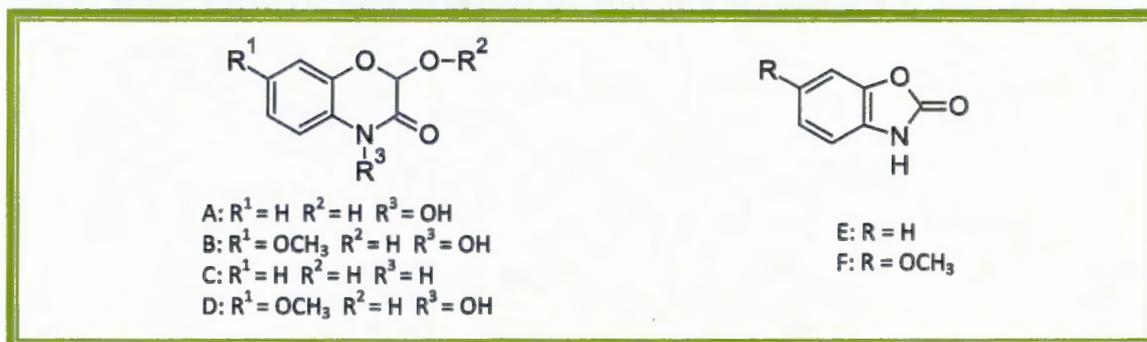


Figura 9. Estructuras químicas de los benzoxazinoides aislados del género *Aphelandra*. A. DIBOA. B. DIMBOA. C. HBOA. D. HMBOA. E. BOA. F. MBOA.

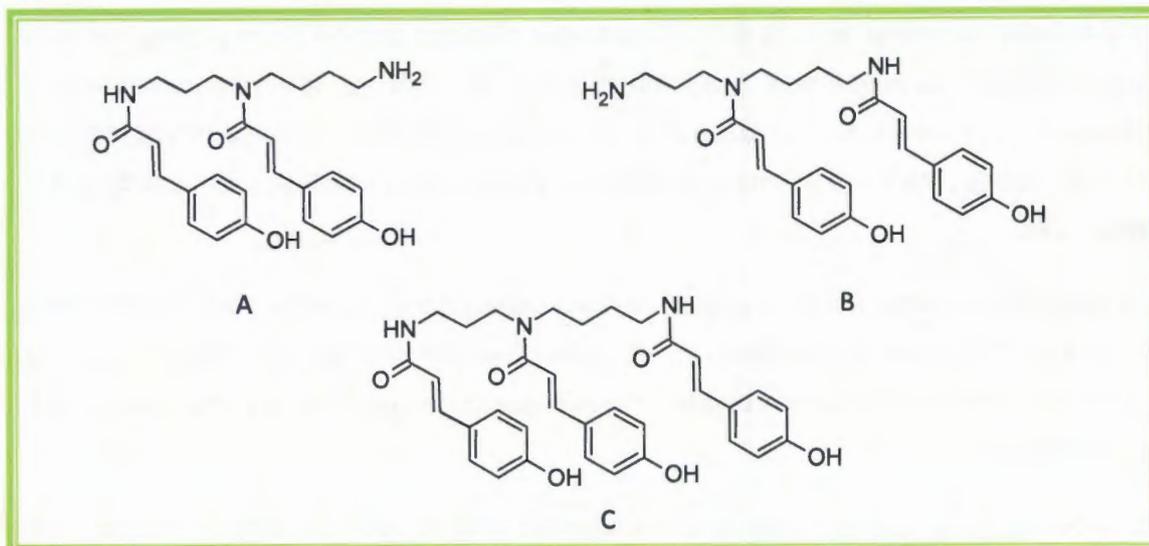


Figura 10. Estructuras químicas de las cumaroil-espermidinas aisladas en el género *Aphelandra*.

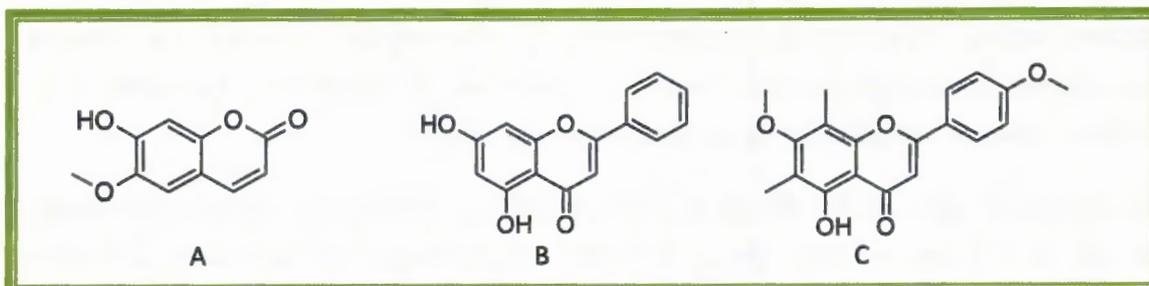


Figura 11. Estructuras químicas de los compuestos aislados de *A. aurantiaca*. A. escopoletina. B. crisina. C. eucalpitina.

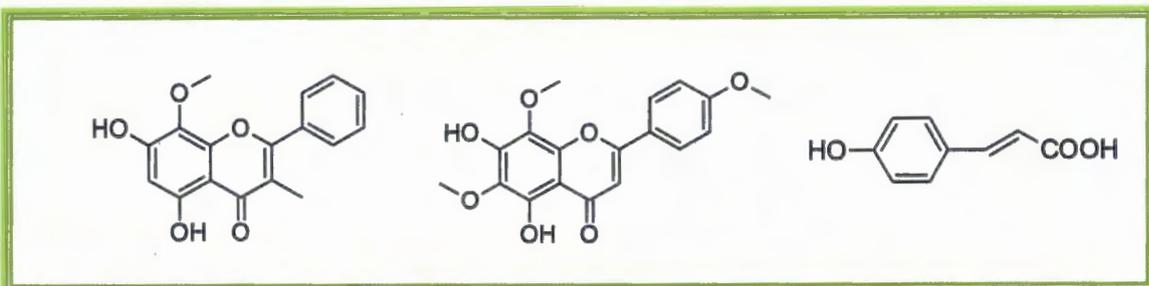


Figura 12. Estructuras químicas de los compuestos aislados de *A. aurantiaca*. A. nevadensina. B. gnafalina. C. ácido *p*-cumárico.

A partir de lo expuesto anteriormente es posible aseverar que *A. scabra* es una especie de gran valor medicinal, que ha sido utilizada por diversos grupos étnicos como remedio contra distintos padecimientos gastrointestinales, del sistema nervioso, circulatorio e infecciones. Los bioensayos realizados a esta planta constituyen una evidencia más del potencial terapéutico de la misma y establecen las bases para estudios farmacológicos y fitoquímicos.

Las propiedades curativas de *A. scabra* podrían deberse a metabolitos secundarios como los que se han podido identificar en el género *Aphelandra*, sin embargo, no se ha realizado un estudio fitoquímico de esta especie que pueda justificar las propiedades que se le atribuyen.

Por otra parte, la giardiasis es una enfermedad muy común en todo el mundo, con síntomas que van de leves hasta agudos, mientras que en infantes ocasiona retardo en el crecimiento debido a la pobre absorción de nutrientes en el intestino. La terapia tradicional para dicha enfermedad incluye fármacos de la familia de los nitroimidazoles, bencimidazoles, furazolidona, paromomicina y nitazoxanida, aunque los efectos secundarios provocados por los mismos ocasionan el abandono del tratamiento, y en muchos casos, la aparición de cepas resistentes del parásito.

Por lo anterior, en este estudio se propone identificar, utilizando un enfoque biodirigido, los metabolitos responsables de la actividad anti-giardiasis de *A. scabra*, así como elucidar sus estructuras químicas, con el fin de evaluar su potencial como tratamiento alternativo contra la giardiasis.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar y purificar los metabolitos secundarios responsables de la actividad anti*giardiásica* producidos por *Aphelandra scabra*.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar los metabolitos secundarios presentes en las fracciones activas del extracto metanólico de *A. scabra* por métodos cromatográficos.
- Contribuir al conocimiento fitoquímico de la especie mediante el aislamiento de metabolitos de las fracciones no activas.
- Elucidar las estructuras químicas de los metabolitos secundarios aislados por métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- Evaluar los metabolitos aislados en el bioensayo de inhibición de crecimiento *in vitro* de *G. lamblia*.

4. HIPÓTESIS

El extracto metanólico de hojas de *Aphelandra scabra* tiene actividad biológica contra el protozooario intestinal *Giardia lamblia*, que se debe a metabolitos secundarios responsables de dicha actividad.

5. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la terapia contra la giardiasis está constituida principalmente por fármacos del grupo de los nitroimidazoles y bencimidazoles así como quinacrina, furazolidona, paromomicina y nitazoxanida. Dichos agentes han sido probados *in vitro*, mostrando una eficacia de media a alta, sin embargo, en los estudios *in vivo* han tenido problemas tales como pérdida de eficacia, cepas que desarrollan resistencia debido al abandono del tratamiento o subdosificación y principalmente efectos secundarios que hacen poco tolerante el tratamiento e incluso tóxico.

Los productos naturales de plantas representan una alternativa en el desarrollo de nuevos fármacos contra *G. lamblia*. Familias de metabolitos entre las que se encuentran flavonoides, terpenoides, alcaloides, entre otros, han sido probados demostrando tener actividades que mejoran el desempeño de fármacos sintéticos *in vitro*. Con base en lo anterior y con la finalidad de contribuir a la resolución de este problema de salud es necesario llevar a cabo un estudio con el propósito de aislar algún compuesto que sirva para el desarrollo de un nuevo fármaco.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se realizó la colecta, secado y molienda de las hojas de *A. scabra*. Posteriormente se llevó a cabo la extracción con metanol y las particiones con disolventes en gradiente de polaridad. Tanto el extracto metanólico como las particiones, fueron sometidos a bioensayos de inhibición *in vitro* contra *G. lamblia*. Se aislaron metabolitos de las fracciones activas, así como de las inactivas por técnicas cromatográficas y se sometieron a bioensayo *in vitro*. La estructura de los mismos se elucidó con técnicas espectroscópicas y espectrométricas (Figura 13).

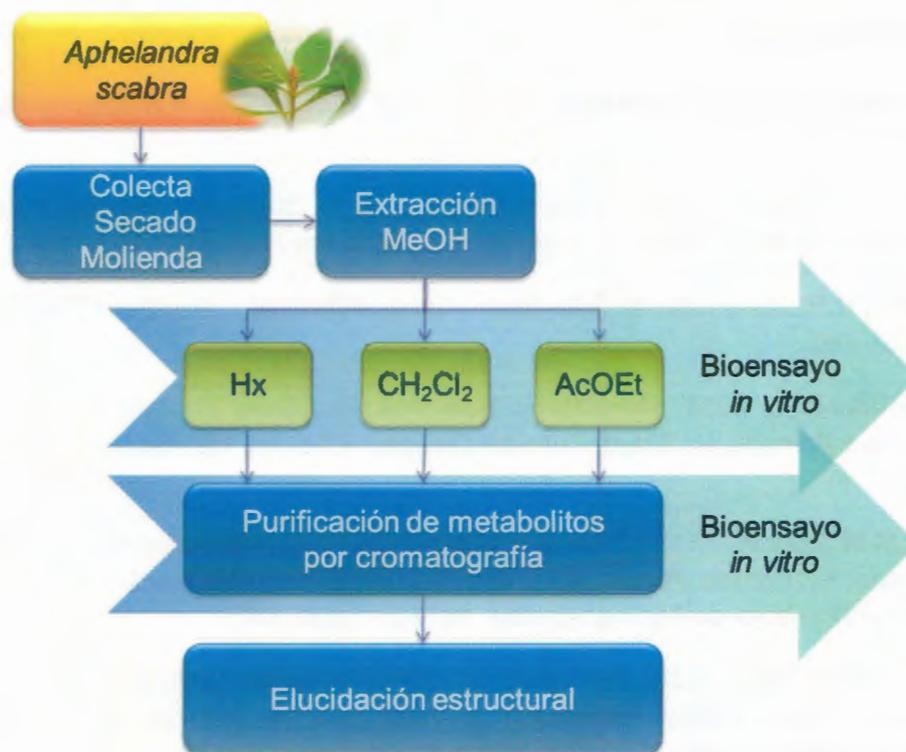


Figura 13. Diagrama de la estrategia experimental.

7. REFERENCIAS

- Adam, R. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 447-475.
- Alanís, A.D.; Calzada, F.; Cedillo-Rivera, R.; Meckes, M. 2003. Antiprotozoal activity of the constituents of *Rubus coriifolius*. *Phytotherapy Research*, 17:681-682.
- Ali, S.A.; Hill, D.R. 2003. *Giardia intestinalis*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16:453-460.
- Alonso-Carbonell, L. 2010. Parasitismo Intestinal. En: Guía Terapéutica para la Atención Primaria en Salud. Editorial Ciencias Médicas. La Habana, Cuba. p. 129.
- Amaral, F.M.M.; Ribeiro, M.N.S.; Barbosa-Filho, J.M.; Reis, A.S; Nascimento, F.R.F.; Macedo, R.O. 2006. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16 (Supl.):696-720.
- Andersen, Y.S.; Gillin, F.D.; Eckmann, L. 2006. Adaptive immunity-dependent intestinal hypermotility contributes to host defense against *Giardia spp*. *Infection and Immunity*, 74:2473-2476.
- Ankarklev, J.; Jerlström-Hultqvist, J.; Ringqvist, E.; Troell, K.; Svard, S.G. 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Reviews: Microbiology*, 8:413-422.
- Ankli, A.; Heinrich, M.; Bork, P.; Wolfram, L.; Bauerfeind, P.; Brun, R.; Schmid, C.; Weiss, C.; Bruggisser, R.; Gertsch, J.; Wasescha, M.; Sticher, O. 2002. Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 79:43-52.
- Barbosa, E.; Calzada, F.; Campos R. 2007. *In vivo* anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*, 109:552-554.
- Barbosa, E.; Calzada, F.; Campos, R. 2006. Anti-giardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* Lag. and *Rubus coriifolius* Focke in suckling mice CD-1. *Journal of Ethnopharmacology*, 108:395-397.
- Berkmann, D.S.; Lescano, A.G.; Gilman, R.H.; López, S.L.; Black, M.M. 2002. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *The Lancet*, 359 (9306):564-571.

-
- Bratoeff, E.A.; Pérez-Amador, M.C. 1994. Phytochemical study of *Aphelandra aurantiaca* Scheider (Acanthaceae). *Phyton*, 56:27-32.
- Bussati, H.G.N.O.; Santos, J.F.G.; Gomes, M.A. 2009. The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: where are we? *Biologics: Targets and Therapy*, 3:273-278.
- Butler, M.S. 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, 67:2141-2153.
- Calzada, F.; Cervantes-Martínez, J.A.; Yépez-Mulia, L. 2005a. *In vitro* antiprotozoal activity from the roots of *Geranium mexicanum* and its constituents on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Journal of Ethnopharmacology*, 98:191-193.
- Calzada, F.; Yépes-Mulia, L.; Aguilar, A. 2006. *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 108:367-370.
- Calzada, F.; Yépez-Mulia, L.; Tapia-Contreras, A.; Bautista, E.; Maldonado, E.; Ortega, A. 2010. Evaluation of the antiprotozoal activity of neo-clerodane type diterpenes from *Salvia polystachya* against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Phytotherapy Research*, 24:662-665.
- Cañete, R.; Escobedo, A.A.; Almirall, P.; González, M.E.; Brito, K.; Cimerman, S. 2009. Mebendazole in parasitic infections other than those caused by soil-transmitted helminths. *Transactions of the The Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 103:437-442.
- Carranza, P. G. y Luján, H. D. 2010. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes and Infection*, 12:71-80.
- Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O. 1992. *In-vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *Journal of Medical Microbiology*, 37:221-224.
- Costa-Brandelli, C.L.; Giordani, R.B.; De Carli, G.A.; Tasca, T. 2009. Indigenous traditional medicine: *in vitro* anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhoea. *Parasitology Research*, 104:1345-1349.
- Dätwyler, P.; Bosshardt, H.; Bernhard, H.O.; Hesse, M. 1978. Die struktur des spermin-alkaloides aphelandrin aus *Aphelandra squarrosa* Nees. *Helvetica Chimica Acta*, 61:2646-2671.
-

- Di Prisco, M.C.; Jiménez, J.C.; Rodríguez, N.; Costa, V.; Villamizar, J.; Silvera, A.; Carrillo, M.; Lira, C.; Zerpa, E.; López, Y. 2000. Clinical trial with secnidazole in a single dose in Venezuelan children infected by *Giardia intestinalis*. *Revista de Investigación Clínica*, 41:179-188.
- Durán, R.; Campos, G.; Trejo, J.C.; Simá, P.; May-Pat, F.; Juan-Qui, M. 2000. Listado florístico de la Península de Yucatán. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.
- Escobedo, A.A.; Alvarez, G.; González, M.E.; Almirall, P.; Cañete, R.; Cimerman, S.; Ruiz A.; Pérez, R. 2008. The treatment of giardiasis in children: single dose tinidazole compared with 3 days of nitazoxanide. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 102:199-207.
- Farthing, M.J.G. 2006. Treatment options for the eradication of intestinal protozoa. *Nature: Clinical Practice*, 38:436-445.
- Flora digital: Península de Yucatán. 2010. *Aphelandra scabra* [Online]. Herbario CICY, Unidad de Recursos Naturales disponible en: http://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=2294 [Acceso 28 diciembre 2011].
- Gardner, T.B.; Hill, D.R. Treatment of giardiasis. 2001. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:114-128.
- Gupta, Y.K.; Gupta, M.; Aneja, S.; Kohli, K. 2004. Current drug therapy of protozoal diarrhea. *Indian Journal of Pediatrics*, 71:55-58.
- Harris, J.C.; Plummer, S.; Lloyd, D. 2001. Antigiardial drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 614-619.
- Hausen, M. A.; Mena-Barreto, R.F.S.; Lira, D.C.; de Carvalho, L.; Barbosa, H.S. 2011. Synergic effect of metronidazole and pyrantel pamoate on *Giardia lamblia*. *Parasitology International*, 60:54-58.
- Hesham, M.S.; Edariah, A.B.; Norhayati, M. 2004. Intestinal parasitic infections and micronutrient deficiency: a review. *The Medical Journal of Malaysia*, 59:284-293.
- Hubert, D.J.; Céline, N.; Johnson, B.N.; Florence, N.T.; Bonaventure, N.T.; Gupta, I.; Van Reddy, G.; Singh, I.P.; Sehgal, R. 2012. Ethnopharmacological investigation and *in vitro* anti-giardial activity of some cameroonian medicinal plants. *Pharmacologia*, 3:672-678.

- Johns, T.; Faubert, G.M.; Kokwaro, J.O.; Mahunnah, R.L.A.; Kimanani, E.K. 1995. Anti-giardial activity of gastrointestinal remedies of the Luo of East Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 46:17-23.
- Jokipii, L.; Jokipii, A.M.M. 1979. Single-dose metronidazole and tinidazole as therapy for giardiasis: success rates, side effects, and drug absorption and elimination. *Journal of Infectious Diseases*, 140:984-988.
- Karabay, O.; Tamer, A.; Gunduz, H.; Kayas, D.; Arinc, H.; Celebi, H. 2004. Albendazole versus metronidazole treatment of adult giardiasis: an open randomized clinical study. *World Journal of Gastroenterology*, 10:1215-1217.
- Katellaris, P. H.; Farthing, M.J.G. 1992. Diarrhoea and malabsorption in giardiasis: a multifactorial process? *Gut*, 33:295-297.
- Khan, I.A.; Avery, M.A.; Burandt, C.L.; Goinst, D.K.; Mikell, J.R.; Nash, T.E.; Azadegan, A.; Walker, L.A. 2000. Antigiardial activity of isoflavones from *Dalbergia frutescens* Bark. *Journal of Natural Products*, 63: 1414-1416.
- Krishnamurty, K.A.; Saradhanbal, V. 1978. Single dose therapy of giardiasis: a comparative study of tinidazole and metronidazole in pediatric patients. *Indian Pediatrics*, 15: 51-56.
- Lane, S.; Lloyd D. 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Critical Reviews in Microbiology*, 28: 123-147.
- Lauwaet, T.; Andersen, Y.; Van de Ven, L.; Eckmann, L.; Gillin, F.D. 2010. Rapid detachment of *Giardia lamblia* trophozoites as a mechanism of antimicrobial action of the isoflavone formononetin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65:531-543.
- Lentz, D.L. 1993. Medicinal and other economic plants of the Paya of Honduras. *Economic Botany*, 47:358-370.
- Lentz, D.L.; Clark, A.M.; Hufford, C.D.; Meurer-Grimes, B.; Passreiter, C.M.; Cordero, J.; Ibrahim, O.; Okunade, A.L. 1998. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 63:253-263.
- Manna, D.; Dutta, P.K.; Achari, B., Lohia, A. 2010. A novel galacto-glycerolipid from *Oxalis corniculata* kills *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54:4825-4832.
- Masis, A.; Pérez, D.; Chavarría, F.; Espinoza, R.; Guadamuz, A. 1998. Species Home Pages [Online], Area de Conservación Guanacaste, Costa Rica. http://www.acguanacaste.ac.cr/paginas_especie/plantae_online/magnoliophyta

/acanthaceae/aphelandra_scabra/a_scabra12ene98/a_scabra12ene98.html
[Acceso 29 diciembre 2011].

- Mena-Rejón, G.J.; Pérez-Espadas, A.R.; Moo-Puc, R.E.; Cedillo-Rivera, R.; Bazzocchi, I.L.; Jiménez-Díaz, I.A.; Qujiano, L. 2007. Antigiardial activity of triterpenoids from root bark of *Hippocratea excelsa*. *Journal of Natural Products*, 70:863-865.
- Meurer-Grimes, B.; McBeth, D.L.; Hallihan, B.; Delph, S. 1996. Antimicrobial activity in medicinal plants of the Scrophulariaceae and Acanthaceae. *Pharmaceutical Biology*, 34:243-248.
- Mineno, T.; Avery, M.A. 2003. Giardiasis: recent progress in chemotherapy and drug development. *Current Pharmaceutical Design*, 9:841-855.
- Mørch, K. 2010. Giardiasis with emphasis on treatment and post-infectious manifestations. Tesis de Doctorado. National Centre for Tropical Infectious Diseases. Bergen, Norway.
- Moya-Mirabal, A.D.; Rodríguez-Leyes, E.A.; Márquez-Conde, T.; López-Peláez, B.; Díaz-Polanco, I. 2003. Estudio de estabilidad de tabletas recubiertas de secnidazol (500 mg). *Latin American Journal of Pharmacy*, 22:223-229.
- Ortega, Y.R.; Adam, R.D. 1997. *Giardia*: overview and update. *Clinical Infectious Diseases*, 25:545-550.
- Peraza-Sánchez, S.R.; Cen-Pacheco, F.; Noh-Chimal, A.; May-Pat, F.; Simá-Polanco, P.; Dumonteil, E.; García-Miss, M.R.; Mut-Martín, M. 2007. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatán peninsula. *Fitoterapia*, 78:315-318.
- Peraza-Sánchez, S.R.; Poot-Kantún, S.; Torres-Tapia, L.W.; May-Pat, F.; Simá-Polanco, P.; Cedillo-Rivera, R. 2005. Screening of native plants from Yucatan for anti-*Giardia lamblia* activity. *Pharmaceutical Biology*, 43:594-598.
- Petri, W.A. 2005. Treatment of giardiasis. *Current Treatment Options in Gastroenterology*, 8:13-17.
- Phillips-Ellis, M.; García-García, A.L.; Elis-Yard, M.L. 2010. Evaluación de diferentes regímenes terapéuticos empleados en el tratamiento de la giardiasis en niños [Online]. *Mediciego*. 16 (Supl. 2). Disponible en:
http://bvs.sld.cu/revistas/mciego/vol16_supl2_10/pdf/t4.pdf [Acceso 29 diciembre 2011]
- Ponce-Macotela, M.; Navarro-Alegría, I.; Martínez-Gordillo, M.N.; Alvarez-Chacón, R. 1994. Efecto anti-giardiasis *in vitro* de 14 extractos de plantas. *Revista de Investigación Clínica*, 46:343-347.

-
- Prado, M.S.; Strina, A.; Barreto, M.L.; Oliveira-Assis, A.M.; Paz, L.M.; Cairncross, S. 2003. Risk factors for infection with *Giardia duodenalis* in pre-scholar children in the city of Salvador, Brazil. *Epidemiology and Infection*, 131:899-906.
- Quihui, L.; Morales, G.G.; Méndez, R.O.; Leyva, J.G.; Esparza, J.; Valencia, M.E. 2010. Could giardiasis be a risk factor for low zinc status in school children from northwestern Mexico? A cross-sectional study with longitudinal follow-up. *BMC Public Health*, 10:85-91.
- Rivera, M.; de la Parte, M.; Hurtado, P.; Magaldi, L.; Collazo, M. 2002. Giardiasis intestinal. Mini-revisión. *Investigación Clínica*, 43:119-128.
- Romero-Cabello, R.; Robert-Guerrero, L.; Muñoz-García, M.R.; Geyne Cruz, A. 1997. Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91:101-103.
- Rossignol, J.F. 2010. *Cryptosporidium* and *Giardia*: Treatment options and prospects for new drugs. *Experimental Parasitology*, 124:45-53.
- Rossignol, J.F.A.; Ayoub, A.; Ayers, M.S. 2001. Treatment of diarrhea caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica* or *E. dispar*: A randomized, double blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. *Journal of Infectious Diseases*, 184:381-384.
- Sánchez-Vega, J.T.; Tay-Zavala, J.; Robert-Guerrero, L.; Romero-Cabello, R.; Ruíz-Sánchez, D.; Rivas-García, C. 2000. Frecuencia de parasitosis intestinales en asentamientos humanos irregulares. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 43:80-83.
- Sawangjaroen, N.; Subhadhirasakul, S.; Phongpaichit, S.; Siripanth, C.; Jamjaroen, K.; Sawangjaroen, K. 2005. The *in vitro* anti-giardial activity of extracts from plants that are used for self-medication by AIDS patients in southern Thailand. *Parasitology Research*, 95:17-21.
- SEDUMA. 2004. Programa de manejo: Parque estatal Lagunas de Yalahau. Secretaría de Ecología, Universidad Autónoma de Yucatán. Anexo 2, p. 84.
- SINAVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica) 2011. Boletín Epidemiológico: Semana 1. Volumen 28, número 1[Online]. Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2010/2010/sem52.pdf>. [Acceso 7 de enero 2013].
- Solaymani-Mohammadi, S.; Genkinger, J.M.; Loffredo, C.A.; Singer, S.M. 2010. A meta-analysis of the effectiveness of albendazole compared with
-

-
- metronidazole as treatments for infections with *Giardia duodenalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4:e682.
- Tawil, B.; Zhu, J.P.; Piantini, U.; Hesse, M. 1989. New spermine alkaloids from *Aphelandra tetragona* (Vahl) Nees. *Helvetica Chimica Acta*, 72:180-184.
- Treyvaud-Amiguet, V.; Arnason, J.T.; Maquin, P.; Cal, V.; Sánchez-Vindas, P.; Poveda, L. 2005. A consensus ethnobotany of the Q'eqchi' maya of southern Belize. *Economic Botany*, 59:29-42.
- Vázquez-Tsuji, O.; Campos-Rivera, T. 2009. Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Revista del Centro de Investigación. Universidad La Salle*, 8:75-90.
- Vera-Ku, M.; Méndez-González, M.; Moo-Puc, R.; Rosado-Vallado, M.; Simá-Polanco, P.; Cedillo-Rivera, R.; Peraza-Sánchez, S.P. 2010. Medicinal potions used against infectious bowel diseases in Mayan traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 132:303-308.
- Werner, C.; Hu, W.; Lorenzi-Riatsch, A.; Hesse, M. 1995. Di-coumaroylspermidines and tri-coumaroylspermidines in anthers of different species of the genus *Aphelandra*. *Phytochemistry*, 40:461-465.
- Wright, C.W.; Allen, D.; Cai, Y.; Chen, Z.; Phillipson, J.D.; Kirby, G.C.; Warhurst, D.C.; Tits, M.; Angenot, L. 1994. Selective antiprotozoal activity of some *Strychnos* alkaloids. *Phytotherapy Research*, 8:149-152.
- Youhnovsky, N.; Filipov, S.; Linden, A.; Guggisberg, A.; Werner, C.; Hesse, M. 1999. Two macrocyclic spermin alkaloids from *Aphelandra fuscopunctata* (Acanthaceae). *Phytochemistry*, 52:1717-1723.

CAPÍTULO II: PURIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *APHELANDRA SCABRA* POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

1. INTRODUCCIÓN

Los productos naturales de plantas representan una alternativa en el desarrollo de nuevos fármacos contra el protozooario intestinal *Giardia lamblia*. Familias de metabolitos entre las que se encuentran flavonoides, terpenoides, alcaloides, entre otros, han sido probados demostrando tener actividades que mejoran el desempeño de fármacos sintéticos *in vitro*. Por tal razón, los investigadores han centrado su búsqueda en plantas que han sido usadas contra malestares gastrointestinales en la medicina alternativa por varias generaciones (Harris *et al.*, 2004).

Una de las plantas usadas en la medicina tradicional es *Aphelandra scabra*, que pertenece a la familia Acanthaceae y habita la región sureste de México, además de Centro y Sudamérica (Flora digital: Península de Yucatán, 2010). De esta planta se han reportado actividades antimicrobiana, antiepiléptica y leishmanicida (Awad *et al.*, 2009; Peraza-Sánchez *et al.*, 2007; Lentz *et al.*, 1998; Meurer-Grimes *et al.*, 1996). Sin embargo, hasta el momento no existe algún reporte de estudio fitoquímico realizado en esta especie. En otras especies del mismo género se han encontrado principalmente alcaloides de tipo espermina (Dätwyler *et al.*, 1978), benzoxazinoides (Baumeler *et al.*, 2000) y coumaroil-espermidinas (Werner *et al.*, 1995). Por lo descrito anteriormente, en este trabajo se busca aislar metabolitos secundarios, elucidar su estructura química y evaluar su potencial como agentes contra *G. lamblia*.

Los métodos en la identificación de compuestos aislados de plantas incluyen la separación de la mezcla cruda por cromatografía y su elucidación, ya sea mediante métodos espectroscópicos, o bien por comparación con estándares de metabolitos ya conocidos (Stace, 1991). Para fines de este trabajo, se emplean diversas técnicas cromatográficas en columna y placa, así como métodos de identificación que consisten en espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía de infrarrojo (IR) y de ultravioleta (UV), además de cromatografía de gases acoplada a masas (CG-EM).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES

Los disolventes utilizados fueron de grado industrial, destilados en el laboratorio, y grado reactivo: hexano (Hx), diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etilo (AcOEt), acetona (An), etanol (EtOH) y metanol (MeOH). Para el secado de extractos y fracciones se utilizó un evaporador rotatorio marca Büchi RE111. Para el análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) se emplearon cromatoplasmas impregnadas con gel de sílice 60 F_{254} (Merck). Para el revelado de las mismas se empleó luz UV de onda corta (254 nm) y de onda larga (365 nm) y una disolución preparada con 20 g de ácido fosfomolibdico y 2.5 g de sulfato cérico en 500 mL de H_2SO_4 acuoso al 5%.

Para la cromatografía líquida al vacío (CLV), se usó como fase estacionaria gel de sílice 60 GF_{254} (200 - 400 mallas, Sigma-Aldrich), mientras que para la cromatografía de exclusión se empleó Sephadex LH-20 (Sigma). Para las columnas cromatográficas por gravedad (CCG) se utilizó gel de sílice 60 (70-230 mallas, Sigma-Aldrich).

El análisis por cromatografía de gases (CG) se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases 6890N acoplado a un espectrómetro de masas 5975B (CG-EM, Agilent Technologies), con la columna Ultra 1 y las condiciones de corrida: 180 °C durante 3 min, una rampa de 10 °C/min hasta 300 °C durante 30 min, velocidad de flujo: 1.5 mL/min y como gas acarreador se empleó helio.

El análisis por espectroscopía de infrarrojo (IR) se realizó en un espectrofotómetro Nicolet, modelo Protegé 460, las muestras se analizaron en pastillas de bromuro de potasio (KBr).

Los análisis de RMN se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance 400 (400 MHz), utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y los desplazamientos (δ) se reportan en partes por millón (ppm).

Los análisis de espectrofotometría de ultravioleta (UV) se llevaron a cabo en un equipo Genesys 10UV ThermoSpectronic, realizando barridos de 200 - 300 y 300 - 400 nm.

2.2 LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA

El trabajo se realizó en el estado de Yucatán, el cual se encuentra localizado en el sureste de México entre 21°36' y 19°32' de latitud norte y 87°32' y 90°25' de longitud oeste (INEGI, 2000), en las instalaciones del Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).

2.3 COLECTA DE LA PLANTA

Las hojas de *Aphelandra scabra* fueron colectadas el 25 de julio de 2010, de su hábitat natural, a 4 Km de la localidad de Pisté, municipio de Tinúm, Yucatán. El número de voucher asignado fue PSimá3019.

2.4 PROCESAMIENTO Y EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las hojas colectadas fueron puestas a secar durante 24 h a temperatura ambiente, seguido de 72 h a 40 °C. Durante este tiempo, las hojas eran removidas al menos una vez al día para que el secado fuera uniforme. Posteriormente fueron molidas, almacenadas y pesadas, obteniéndose 3.018 Kg de material seco.

Debido al volumen del material, la extracción se realizó en un reactor de acero inoxidable de la siguiente manera: el material seco y molido fue depositado en el reactor, enseguida se adicionó MeOH hasta cubrir completamente al mismo y se dejó en maceración durante 24 h. Pasado este tiempo se colectó el disolvente por decantación para su evaporación al vacío. Esta operación se realizó dos veces en total.

Los extractos concentrados se vaciaron en recipientes abiertos Pyrex® y fueron colocados en campanas de extracción para que se secaran completamente. Una vez secos, fueron recuperados en un solo frasco y pesados.

2.5 PARTICIÓN DEL EXTRACTO METANOLICO

Para la partición fueron pesados 100 g del extracto metanólico de *A. scabra* e inmediatamente disueltos en 200 mL de MeOH, al que se añadieron tres partes de agua (600 mL) para formar la fase hidroalcohólica. Dicha fase se colocó en un embudo de separación y fue extraída primeramente con Hx por triplicado, para lo que se utilizaron 1,600, 800 y 800 mL, respectivamente, para alcanzar las proporciones 2:1, 1:1 y 1:1. El mismo procedimiento se realizó con los disolventes CH_2Cl_2 y AcOEt (Figura 14). Es importante señalar que se formaba una capa de precipitado entre las dos fases de todas las particiones que se mantuvo al final con la fase acuosa. Las fracciones resultantes de cada extracción se reunieron de acuerdo al disolvente y fueron evaporadas al vacío. Posteriormente se colocaron en viales y se dejaron secar a temperatura ambiente.

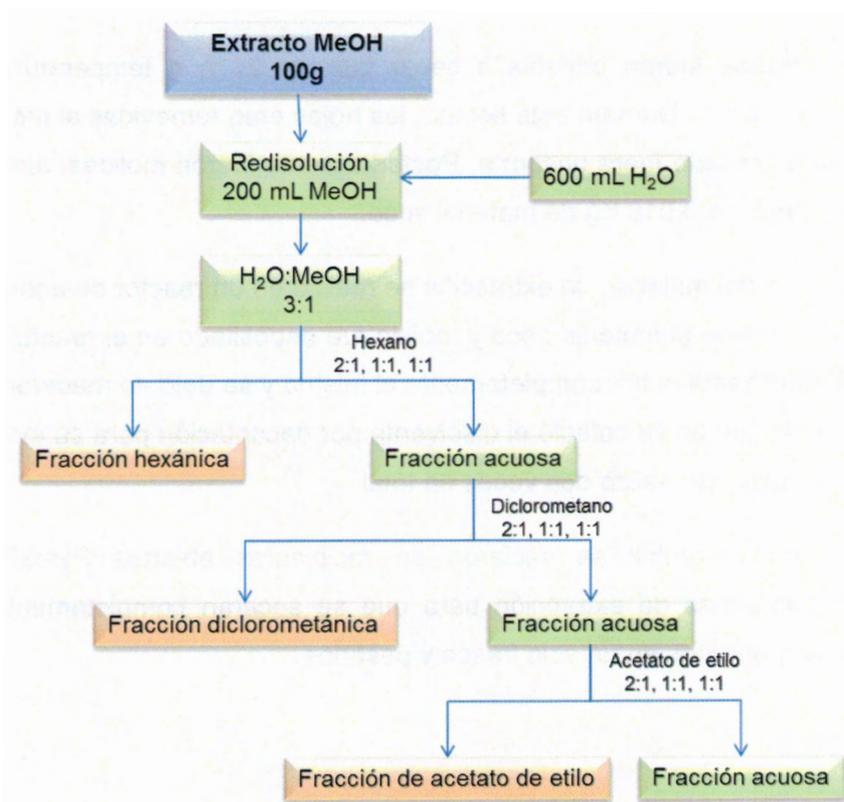


Figura 14. Diagrama de la obtención de fracciones por partición con disolventes en gradiente de polaridad.

2.6 PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN HEXÁNICA

Para iniciar el estudio de la fracción hexánica, la misma se sometió a una columna líquida al vacío (CLV) con el objetivo de separar los metabolitos de acuerdo a un gradiente de polaridad en forma ascendente. Para tal efecto, una muestra de 5 g de dicha fracción, se usó para formar la cabeza cromatográfica con gel de sílice (70-230 mallas) que fue colocada en una columna de 6 cm de diámetro y 5 cm de altura, empacada con gel de sílice (200-400 mallas). Como fase móvil se utilizaron los disolventes: Hx, Hx/An, Hx/AcOEt y AcOEt/MeOH. Se obtuvieron 12 fracciones de 250 mL que fueron reunidas de acuerdo a sus perfiles de CCD en seis fracciones que se secaron y pesaron.

2.6.1 AISLAMIENTO DEL COMPUESTO 1

La fracción 1 (22.5 mg), proveniente de la CLV de la fracción hexánica, presentaba una mancha amarilla y abundante, visible bajo luz natural al ser plaqueada por CCD, mientras que con ácido fosfomolibdico tomaba una coloración azul. La purificación final del metabolito se realizó mediante una columna de gravedad, de 1 cm de diámetro y 50 cm de altura. Como fase estacionaria se utilizó gel de sílice 60 (70-230 mallas) y como fase móvil se empleó hexano al 100%.

Se obtuvieron 21 fracciones, que fueron reunidas en cinco finales de acuerdo a sus perfiles cromatográficos por CCD. Como resultado se aisló un compuesto puro al que se asignó el número 1 (Figura 15).

Compuesto 1 (2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-, (all-E)):
 $C_{30}H_{50}$; consistencia aceitosa, color amarillo-anaranjado. CG-EM $t_R = 13.168$ min, m/z (%): 410 ($[M+H]^+$, 1), 341 (3), 273 (1), 137 (14), 95 (18), 41 (37), 69 (100, pico base).

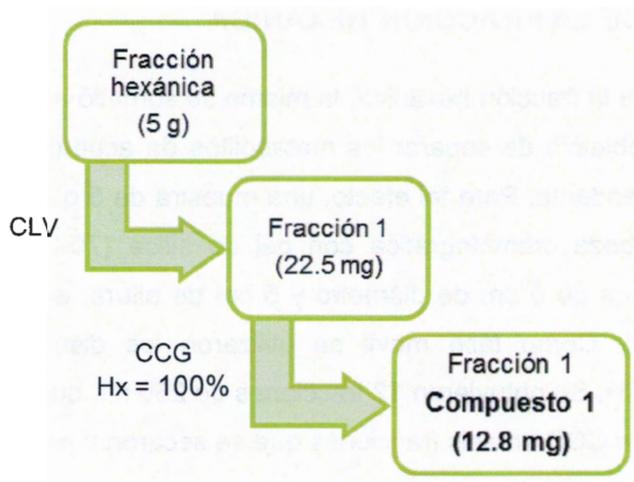


Figura 15. Diagrama de purificación del compuesto 1.

2.7 PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN DICLOROMETÁNICA

Para el análisis de esta fracción, se tomaron 4 g de la misma y se sometieron a una CLV de 6 cm de diámetro y 5 cm de altura. Se utilizó un sistema de disolventes en gradiente de polaridad Hx, Hx/An, An/MeOH. Resultaron 13 fracciones de 250 mL, algunas de las cuales fueron reunidas de acuerdo a su perfil de CCD en 11 fracciones finales, que se pesaron después de haberse secado completamente.

2.7.1 AISLAMIENTO DEL COMPUESTO 2

La fracción 8 (103.9 mg) de la CLV anterior, presentaba una sola mancha en placa cromatográfica realizándose lavados con MeOH para purificar el metabolito. Por medio de CCD se confirmó la pureza del mismo y se le asignó el número 2 (Figura 16). Asimismo, se observó que este metabolito se encuentra también casi puro en la fracción 5 de la CLV.

Compuesto 2 (Cirsimaritina): $C_{17}H_{14}O_6$; Cristales amarillos con forma de aguja; Punto de fusión: 253.8-256.2 °C. R_f : 0.37 en sistema Hx/An (2:1; 2 \times), 0.66 en sistema CH_2Cl_2 /MeOH 4.5:0.5. UV (An:H₂O; 99:1) λ_{max} nm (log ϵ): 209 (3.21), 330 (3.39). IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3283, 1655, 1600, 1570, 1465, 1445, 1356, 1037, 853. RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.72 (3H, s, 6-OCH₃), 3.90 (3H, s, 7-OCH₃), 6.81 (1H, s, H-3), 6.87 (1H, s, H-

8), 6.92 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3',H-5'), 7.93 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2',H-6'), 12.91 (1H, s, 5-OH). RMN- ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 55.7 (6-OCH $_3$), 59.7 (7-OCH $_3$), 101.4 (C-8), 103.0 (C-3), 104.6 (C-10), 114.7 (C-3'), 116.3 (C-5'), 120.7 (C-1'), 127.3 (C-2'), 128.9 (C-6'), 131.4 (C-6), 151.6 (C-9), 152.2 (C-5), 158.1 (C-7), 160.8 (C-4'), 163.6 (C-2), 181.7 (C-4).

Una vez aislado este metabolito, se procedió a investigar las fracciones 4, 5, 6, 7 y 8, en las cuales se presentaba como el compuesto mayoritario. Para lo anterior, las mismas se sometieron a diversos tipos de cromatografía, debido a que presentaban un complejo perfil y se mostraban en ellos varios tipos de clorofilas. Los métodos cromatográficos empleados fueron columnas de exclusión molecular y CLV, así como recristalización con MeOH.

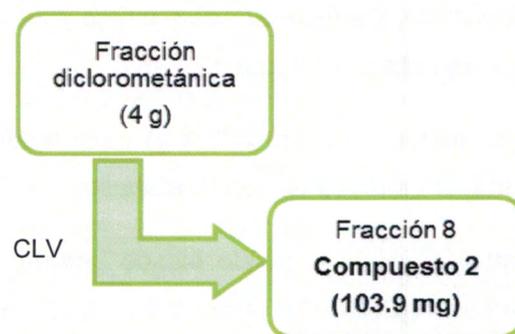


Figura 16. Diagrama de purificación del compuesto 2.

Este compuesto también se aisló a partir de la fracción 3 de la fracción hexánica, la cual se sometió a una CLV con disolventes en gradiente de polaridad (Hx/AcOEt y AcOEt/MeOH). Como resultado se obtuvieron 14 fracciones, de las cuales, la 8 presentó este metabolito, que posteriormente fue purificado con una columna de exclusión molecular, teniendo como sistema MeOH = 100%. Inicialmente se pensó que se trataba de otro metabolito, sin embargo por comparación de sus espectros de $^1\text{H-NMR}$ se confirmó que era el compuesto 2.

2.8 PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN DE ACETATO DE ETILO

Con el objetivo de purificar más compuestos, la fracción de acetato de etilo (3.8 g) se sometió a una CLV con disolventes en gradiente de polaridad Hx/An, An y An/MeOH en una columna de 6 cm de diámetro y 5 cm de altura. Se obtuvieron 12 fracciones de 250 mL que fueron reunidas de acuerdo a sus perfiles de CCD en nueve fracciones que se secaron y pesaron.

2.8.1 AISLAMIENTO DEL COMPUESTO 3

La fracción 8 de la CLV anterior presentaba dos componentes mayoritarios y con diferencia de polaridad. Se tomó una muestra de la misma y al agregar MeOH se formó un sobrenadante y un precipitado. Se recuperó este último y se le realizaron lavados con An/MeOH (1:1) y MeOH para purificarlo (Figura 17).

Adicionalmente, se tomó la misma fracción (372.8 g) y por medio de recristalización con MeOH, se hizo precipitar mayor cantidad de este metabolito.

Compuesto 3 (Cirsimarina): $C_{23}H_{24}O_{11}$; sólido blanco amorfo. Punto de fusión: 175.8-176.3 °C. R_f : 0.50 en sistema $CH_2Cl_2/MeOH$ (4.5:0.5; 3 \times), 0.22 en sistema Hx/An (1:1). UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 213 (4.89), 277 (4.72), 323 (4.75). IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3350, 1660, 1600, 1565, 1460, 1440, 1356, 1047, 833. RMN- 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.74 (3H, s, 6-OCH $_3$), 3.93 (3H, s, 7-OCH $_3$), 4.65 (1H, s, 6''-OH), 5.05 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1''), 5.12 (1H, s, 4''-OH), 5.20 (1H, s, 3''-OH), 5.45 (1H, s, 2''-OH), 6.97 (1H, s, H-3), 6.98 (1H, s, H-8), 7.20 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', H-5'), 8.08 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', H-6'), 12.86 (1H, s, 5-OH). RMN- ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 55.6 (7-OCH $_3$), 60.1 (6-OCH $_3$), 60.7 (C-6''), 69.7 (C-4''), 73.2 (C-2''), 76.6 (C-5''), 77.2 (C-3''), 91.7 (C-8), 99.8 (C-1''), 103.7 (C-3), 105.2 (C-10), 116.6 (C-3', C-5'), 123.9 (C-1'), 128.3 (C-2', C-6'), 131.9 (C-6), 152.1 (C-5), 152.7 (C-9), 158.8 (C-7), 160.4 (C-4'), 163.4 (C-2), 182.4 (C-4).

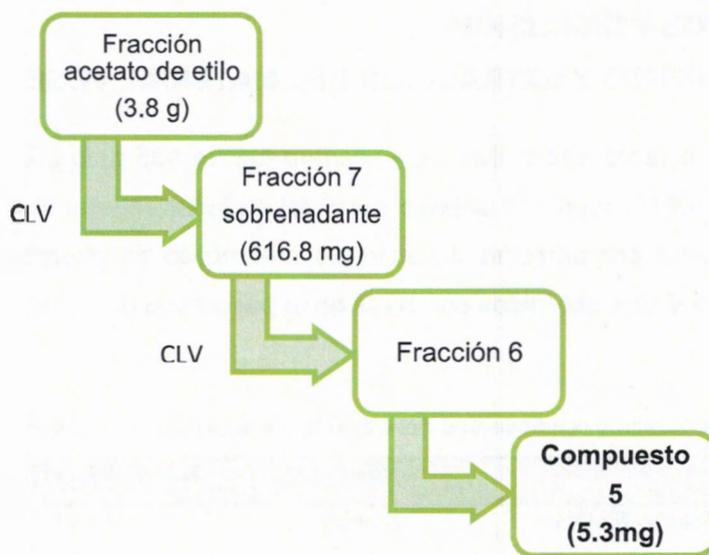


Figura 19. Diagrama de purificación del compuesto 5.

Compuesto 5 (Sorbifolín-6-O- β -glucopiranosido). $C_{22}H_{18}O_{10}$. Sólido blanco. Rf: 0.62 en sistema $CH_2Cl_2/MeOH$ (4:1), 0.30 en sistema $CH_2Cl_2/MeOH$ (4.5:0.5). UV (An:H₂O; 62.5:1) λ_{max} nm (log ϵ): 209 (3.16), 329 (3.04). IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3500-3100, 1660, 1605, 1565, 1500, 1460, 1356, 1047. RMN-¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.58 (1H, dd, $J = 4.0, 11.1$, 6b''-OH), 3.90 (3H, s, 7-OCH₃), 4.12 (1H, dd, $J = 5.0, 10.4$, 6a''-OH), 4.32 (1H, t, $J = 5.48$, 5''-OH), 4.94 (1H, d, $J = 5.2$, H-1''), 5.03 (1H, d, $J = 4.8$, 4''-OH), 5.05 (1H, s, 3''-OH), 5.17 (1H, d, $J = 3.32$, 2''-OH), 6.86 (1H, s, H-3), 6.92 (2H, d, $J = 8.72$, H-3', H-5'), 6.93 (1H, s, H-8), 7.97 (2H, d, $J = 8.72$, H-2', H-6'), 10.43 (1H, sa, 4'-OH), 13.06 (1H, sa, 5-OH). RMN-¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 56.6 (7-OCH₃), 60.9 (C-6''), 69.9 (C-4''), 74.2 (C-2''), 76.6 (C-5''), 77.3 (C-3''), 91.7 (C-8), 102.0 (C-3), 102.7 (C-1''), 104.9 (C-10), 116.0 (C-3', C-5'), 121.1 (C-1), 128.1 (C-6), 128.6 (C-2', C-6'), 151.7 (5-OH), 152.6 (C-9), 158.6 (C-7), 161.3 (C-4'), 164.0 (C-2), 182.3 (C-4).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 PROCESAMIENTO Y EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El peso total del extracto metanólico de *A. scabra* fue de 435 g, lo que corresponde a un rendimiento de 14.41% respecto al peso seco del material vegetal. De igual manera, las fracciones obtenidas por partición del extracto metanólico se pesaron y se procedió a calcular los rendimientos obtenidos con base en el peso seco del material vegetal (Cuadro 4).

Cuadro 2. Pesos y rendimientos del extracto y fracciones de *Aphelandra scabra*.

	PESO (g)	RENDIMIENTO (%)
Extracto MeOH	435	14.41
Fracción Hx	21.5	0.71
Fracción CH ₂ Cl ₂	4.3	0.14
Fracción AcOEt	4.6	0.15
Ppt fracción acuosa	1.6	0.05
Fracción acuosa	62	2.05

Por otro lado, se tomaron muestras tanto del extracto metanólico así como de las fracciones resultantes de la partición para realizar los perfiles cromatográficos que se muestran en la Figura 20.

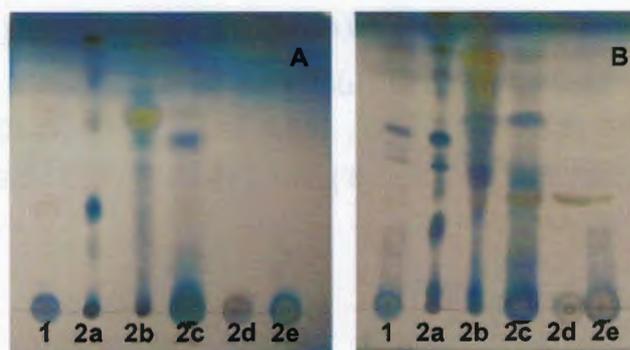


Figura 20. Perfiles cromatográficos del extracto metanólico y fracciones de *A. scabra*. A. Sistema Hx/An; 1:1. B. Sistema CH₂Cl₂/MeOH; 4.5:0.5.

3.2 AISLAMIENTO DE METABOLITOS

3.2.1 CLV DE LA FRACCIÓN HEXÁNICA

Siguiendo el objetivo de contribuir a la información sobre la fitoquímica de esta planta, se analizó la fracción hexánica. Para tal fin, dicha partición fue sometida a una CLV donde se obtuvieron 12 fracciones de 250 mL que fueron reunidas de acuerdo a sus perfiles de CCD en seis fracciones finales (Figura 21).

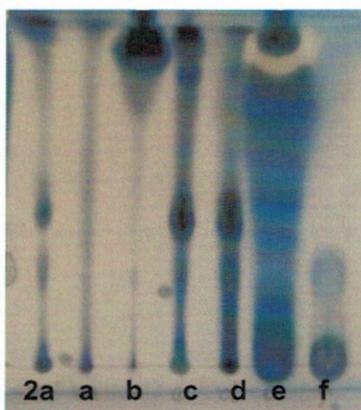


Figura 21. Perfil cromatográfico de las fracciones resultantes de la CLV de la fracción hexánica. Sistema Hx/An; 2:1

3.2.1.1 ANÁLISIS DEL COMPUESTO 1

Este metabolito se obtuvo como un sólido amarillo de consistencia aceitosa, soluble en Hx y CH_2Cl_2 , rindiendo en total 12.8 mg. La caracterización de este compuesto se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a masas (CG-EM), por comparación con la base de datos NIST y se identificó como 2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-, (all-E) o escualeno (Figura 22).

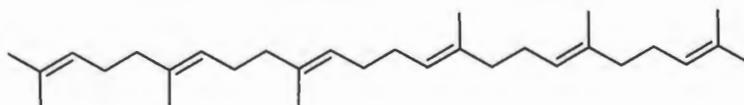


Figura 22. Estructura química del escualeno.

En el cromatograma de gases (Figura 23), se puede observar un tiempo de retención (t_R) del compuesto de 13.168 min. El espectro de masas (Figura 24) muestra un ión $[M^+]$ a m/z

410 indicando el peso molecular y un pico base a m/z 69, correspondiente a la pérdida de una unidad de isopreno, lo que al mismo tiempo explica el pico a m/z 341, equivalente al resto de la molécula de escualeno que lo ha perdido (Oyugi *et al.*, 2011). Otro pico se observa en m/z 137 y representa la pérdida de dos moléculas de isopreno, apareciendo el peso del fragmento restante en el pico a m/z 273.

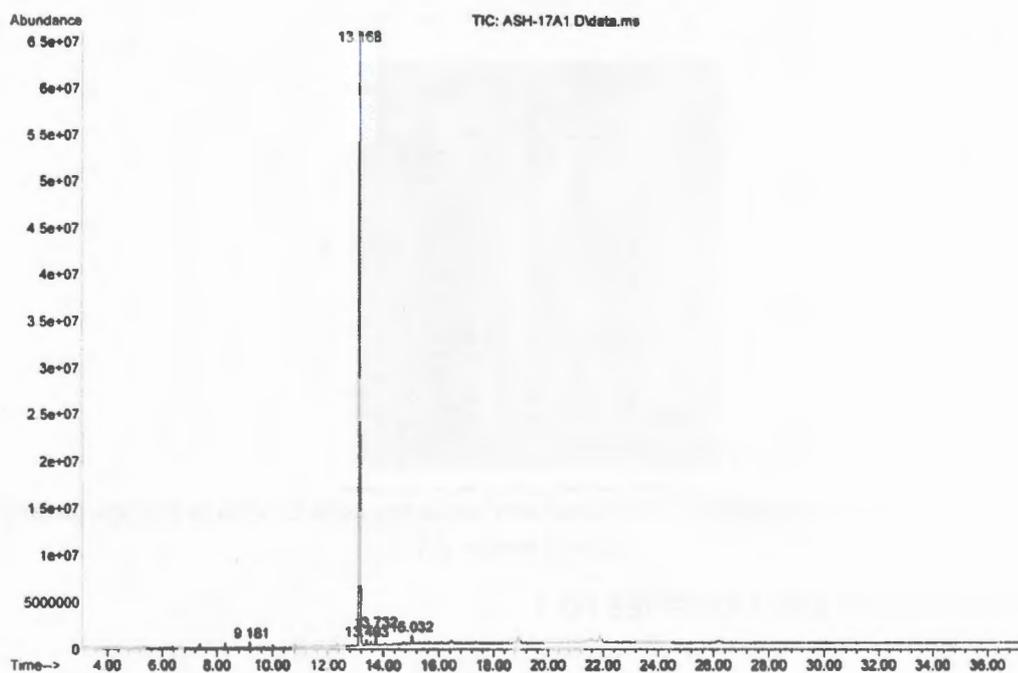


Figura 23. Cromatograma de gases del compuesto 1.

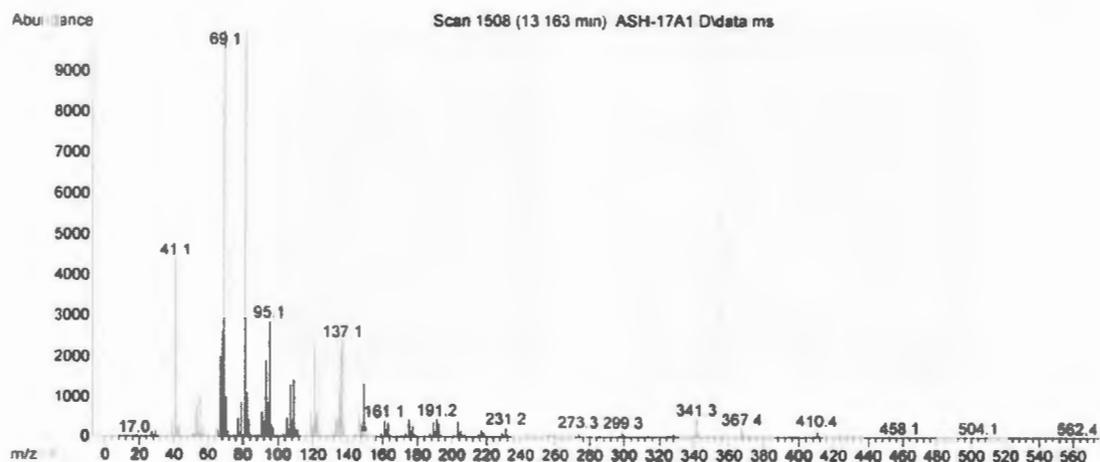


Figura 24. Espectro de masas del compuesto 1.

El escualeno fue originalmente aislado del hígado de tiburón (*Squalus sp.*), después fue encontrado en hígado de ratas, así como en levaduras (Dewick, 2002). En las especies vegetales se encuentra especialmente en aceitunas, germen de trigo y salvado de arroz, de modo que se consume como parte integral de la dieta humana. Asimismo, en los humanos éste se sintetiza en la piel y el hígado, viajando a través del torrente sanguíneo.

Recientemente Reddy y Couvreur (2009) realizaron una revisión acerca del uso de este metabolito en terapia y control de enfermedades. Ellos reportan que debido a sus beneficios en la dieta, biocompatibilidad y otras propiedades, es usado ampliamente como excipiente en formulaciones farmacéuticas, pero también se ha descubierto que posee actividad quimiopreventiva y contribuye a disminuir efectos secundarios de los medicamentos, así como a aumentar la respuesta inmune.

3.2.2 CLV DE LA FRACCIÓN DICLOROMETÁNICA

Como resultado de este experimento se obtuvieron 13 fracciones de 250 mL, algunas de las cuales fueron reunidas de acuerdo a su perfil de CCD en 11 fracciones finales (Figura 25).

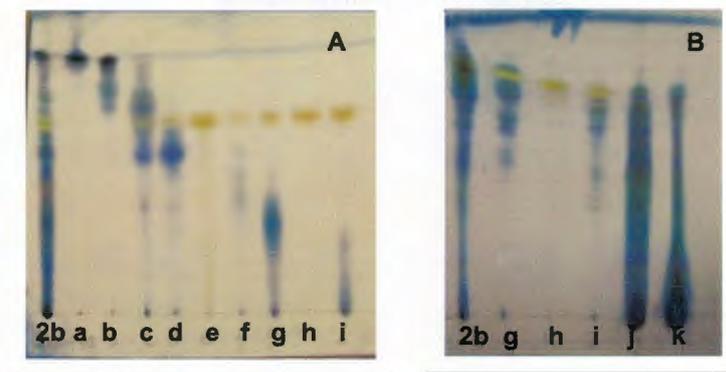


Figura 25. Perfil cromatográfico de las fracciones resultantes de la CLV de la fracción diclorometánica. A. Sistema Hx/An; 1:1. B. Sistema CH₂Cl₂/MeOH; 4.5:0.5.

3.2.2.1 ANÁLISIS DEL COMPUESTO 2

La fracción 8 (Figura 25h) presentaba una sola mancha y se le realizaron lavados con MeOH para purificar el metabolito, obteniéndose 103.9 mg. El compuesto 2 mostraba cristales amarillos solubles únicamente en DMSO. Adicionalmente mayor cantidad de dicho compuesto fue aislada a partir de las fracciones 4, 5, 6 y 7, como se indica en el Cuadro 3, haciendo un total de 465.6 mg. Por otro lado, fue posible obtener 6.3 mg a partir de la partición hexánica, por medio de CLV, como se explica en el apartado 2.7.1., con lo que se comprueba que el metabolito está presente en ambas fracciones, encontrándose mayor cantidad en la fracción diclorometánica.

Cuadro 3. Métodos de separación y cantidad de cirsimaritina aislada a partir de las fracciones resultantes de la purificación por CLV de la fracción diclorometánica.

Fracción	Peso (mg)	Método de separación	Peso cirsimaritina (mg)
4	230.2	Exclusión molecular	50.4
5	66.5	Recristalización MeOH	66.5
6	421.2	CLV	183.3
7	259.7	Exclusión molecular	61.5

En el espectro de RMN-¹H de este compuesto (Figura 26), se observaron señales simples de metoxilo a δ 3.72 y 3.90, que se confirman con dos señales de carbonos a δ 59.75 y δ 55.77 en el espectro de RMN-¹³C (Figura 27). También se observaron dos señales simples a δ 6.81 y 6.87 correspondientes a protones unidos a los carbonos 3 y 8, respectivamente. De igual manera, se encontraron dos señales dobles a δ 6.92 y 7.93 ($J = 8.8$ Hz) que pertenecen a los protones unidos a los carbonos 3' y 5' y 2' y 6', respectivamente, conformando un sistema AA'BB'. Se observó también una señal correspondiente al protón de un grupo hidroxilo quelatado a δ 12.91, la cual es confirmada por la señal a δ 152.1 de carbono unido a grupo OH y la absorción en la región de 3283 cm^{-1} del IR, debida al alargamiento O-H. Asimismo, en el espectro de IR se puede observar una banda intensa a 1655 cm^{-1} que se debe al alargamiento del enlace C=O y que explica la señal a δ 181.7 perteneciente al grupo carbonilo en C-4 (Figura 28).

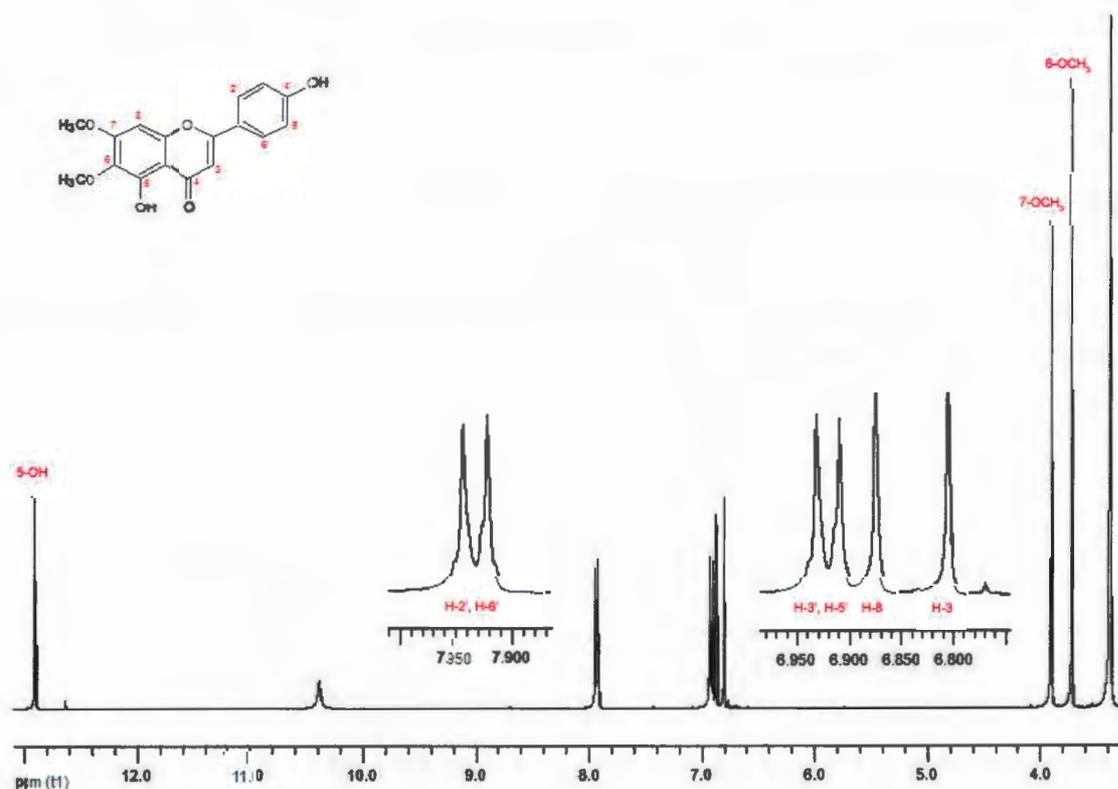


Figura 26. Espectro de RMN-¹H del compuesto 2 con la estructura de circimaritina indicando los protones de las señales observadas.

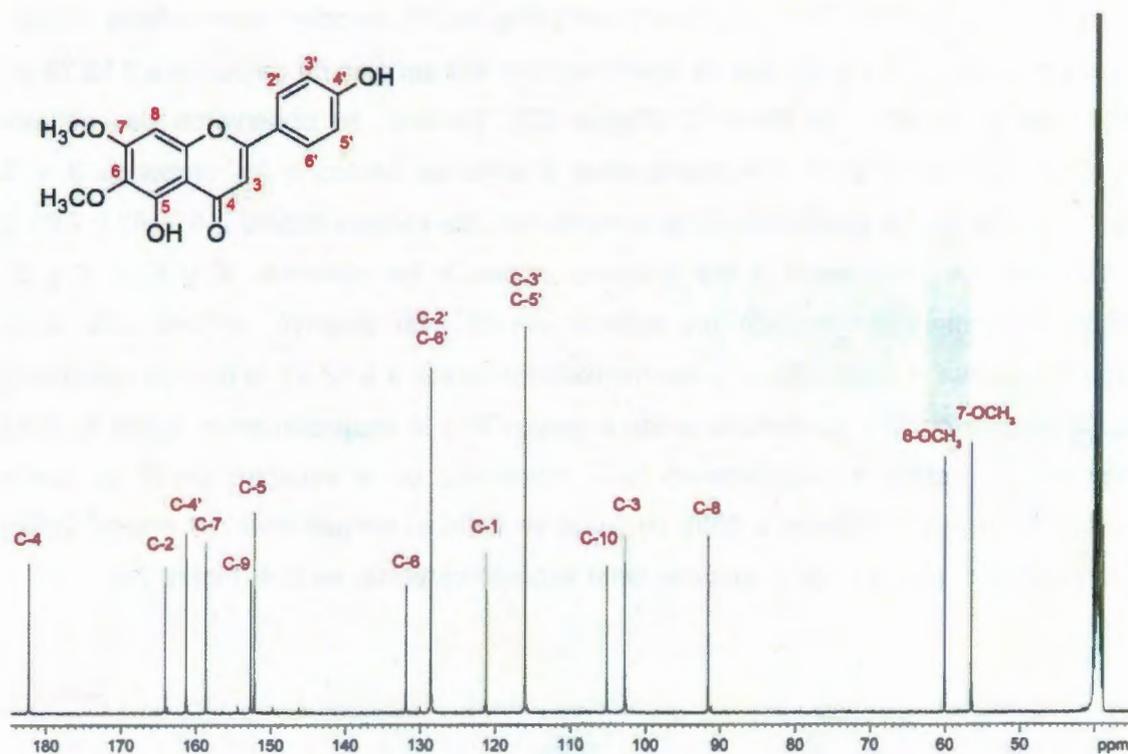


Figura 27. Espectro de RMN-¹³C del compuesto 2 con la estructura de la cirsimaritina indicando los carbonos de las señales observadas.

Con base en los espectros anteriores y por comparación de sus desplazamientos químicos con los reportados en la literatura (Cuadro 4), se pudo deducir que el compuesto 2 corresponde a cirsimaritina (Figura 29).

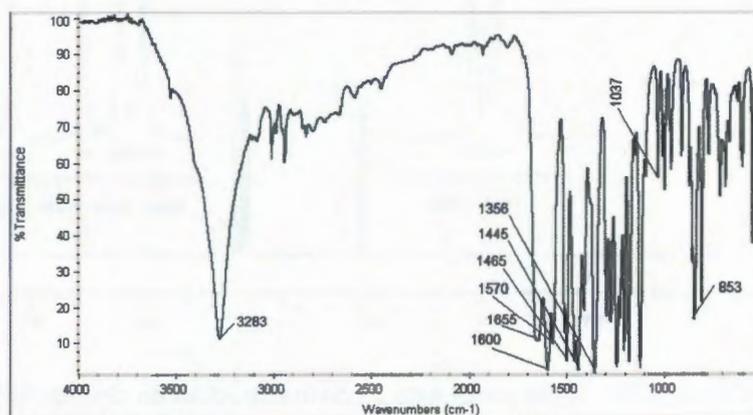


Figura 28. Espectro de IR del compuesto 2 indicando las señales más importantes.

Cuadro 4. Comparación de los desplazamientos del espectro de RMN-¹H (400 MHz) del compuesto 2 y de cirsimaritina en DMSO.

Posición	Compuesto 2	Cirsimaritina ¹
6-OCH ₃	3.72	3.72
7-OCH ₃	3.90	3.90
H-3	6.81	6.83
H-8	6.87	6.91
H-3',H-5'	6.92d (J = 8.8 Hz)	6.92d (J = 6 Hz)
H-2',H-6'	7.93d (J = 8.8 Hz)	7.95d (J = 6 Hz)
5-OH	12.91	

¹ Tomado de Lin *et al.*, 2006.

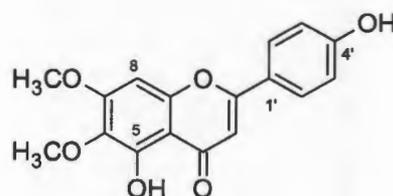


Figura 29. Estructura del compuesto cirsimaritina.

La cirsimaritina ha sido aislada de otras especies como: *Cirsium rhinoceros* (Yim *et al.*, 2003), *Stizolophus balsamita* (Suleimenov *et al.*, 2008) y *Helychrisum viscosum* (Geissman *et al.*, 1967) de la familia Asteraceae; *Teucrium ramosissimum* (Ben Sghaier *et al.*, 2011), *Dracocephalum multicaule* (Oganesyanyan, 2009) y *Ocimum sanctum* (Kelm *et al.*, 2000) de la familia Lamiaceae, así como en *Microtea debilis* (Phytolaccaceae) (Bai *et al.*, 2011). Este flavonoide ha sido encontrado también en la especie *Ruellia tuberosa*, de la familia Acanthaceae, misma a la que pertenece *Aphelandra* (Lin *et al.*, 2006).

De acuerdo con la literatura, esta molécula ha sido objeto de estudios para evaluar diferentes actividades biológicas, presentando buenos resultados en la mayoría de ellos. Por ejemplo, Ben Sghaier *et al.* (2011) probaron la capacidad antioxidante de la

cirsimaritina obteniendo un Equivalente de Capacidad Antioxidante de Trolox (TEAC, por sus siglas en inglés) igual a $2.04 \mu\text{M}$. En otro estudio se reporta que la cirsimaritina tiene una citotoxicidad de $30.05 \mu\text{g/mL}$ *in vitro* contra la línea celular KB de carcinoma humano nasofaríngeo (Lin *et al.*, 2006). De igual manera, se encontró que inhibe el crecimiento de células tumorales e induce apoptosis mitocondrial en células de cáncer de vesícula biliar (GBC-SD) y tiene una citotoxicidad contra las mismas con una $\text{IC}_{50} = 5 \mu\text{M}$ en un sistema dosis-dependiente (Quan *et al.*, 2010). Este compuesto ha mostrado también una moderada actividad antiproliferativa contra células de adenocarcinoma humano (COLO-205), observándose un valor de $\text{IC}_{50} = 13.10 \mu\text{M}$ (Bai *et al.*, 2011).

3.2.3 CLV DE LA FRACCIÓN DE ACETATO DE ETILO

Al someter a una purificación por CLV dicha fracción, se obtuvieron 12 fracciones de 250 mL que fueron reunidas de acuerdo a sus perfiles de CCD en 9 fracciones (Figura 30).

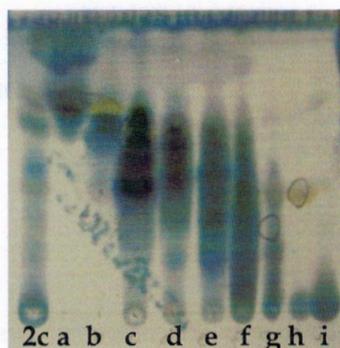


Figura 30. Perfil cromatográfico de las fracciones resultantes de la CLV de acetato de etilo. Sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; 4.5:0.5.

3.2.3.1 ANÁLISIS DEL COMPUESTO 3

La fracción 8 presentaba dos componentes mayoritarios y con diferencia de polaridad (Figura 30h). Al realizar lavados con MeOH se obtuvieron 55.1 mg del metabolito de menor polaridad en forma pura. Este compuesto es un polvo blanco amorfo, soluble únicamente en DMSO.

En el espectro de RMN-¹H de dicho metabolito (Figura 31) se observaron señales de metoxilo a δ 3.74 y 3.93, que se confirman con las señales a δ 56.5 y 60.0 encontradas en el espectro de carbono. A δ 4.65, 5.12, 5.20 y 5.45 se identificaron señales pertenecientes a protones de grupos OH en el esqueleto de glucosa, el cual corroboran las señales presentadas a δ 60.7, 69.7, 73.2 76.6, 77.2, 99.8 en el espectro de RMN-¹³C (Figura 32). Para el caso del protón anomérico a δ 5.12, se muestra una $J = 7.08$ Hz, lo que sugiere una configuración β . También se encontraron dos singuletes a δ 6.97 y 6.98, que corresponden a dos protones unidos a carbonos en posiciones 3 y 8, respectivamente. Se observan de igual manera dos señales dobles a δ 7.20 y 8.08, las cuales pertenecen a los protones unidos a los carbonos 3', 5' y 2', 6' del flavonoide, conformando un sistema AA'BB'. Se aprecia también una señal a δ 12.86 que indica la presencia de un protón de alcohol quelatado asignado a la posición 5, que confirma la señal a observada en el carbono a δ 152.1, así como la banda ancha en la región de 3522-3009 cm^{-1} del IR. Finalmente se observa un carbono a δ 182.4, perteneciente al grupo carbonilo, el cual

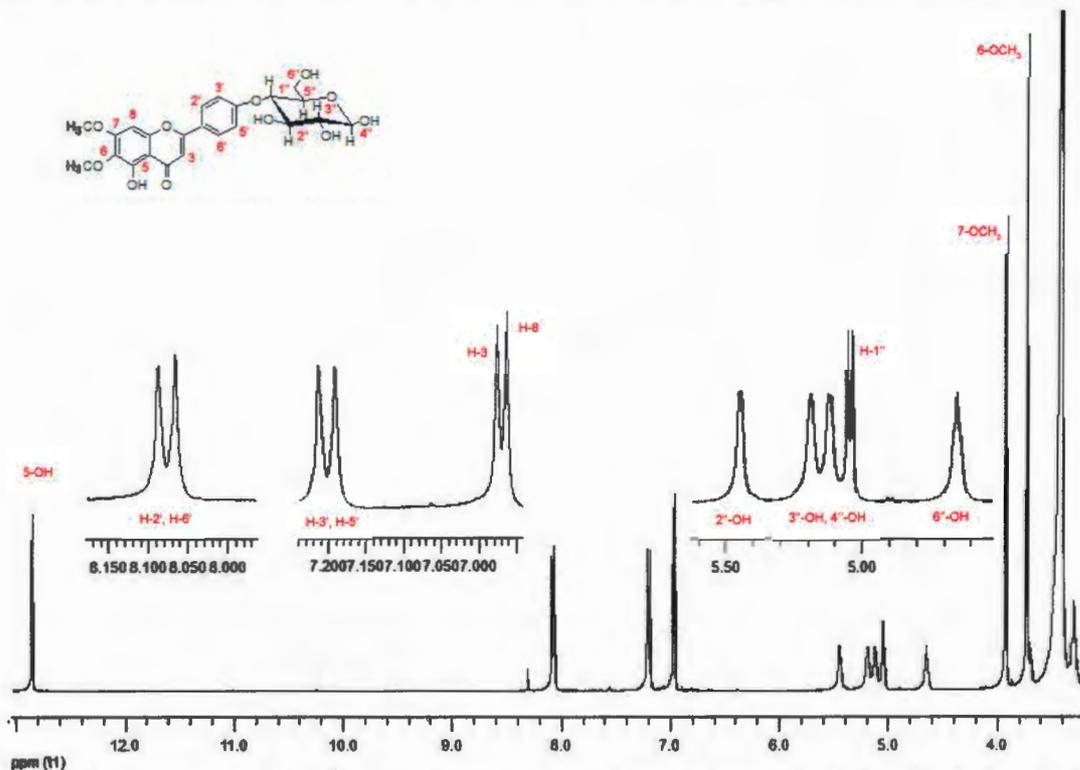


Figura 31. Espectro de RMN-¹H del compuesto 3 con la estructura de la cirsimarina indicando los protones de las señales observadas.

corroborar la absorción intensa a 1660 cm^{-1} (Figura 33).

Con base en los datos espectroscópicos y por comparación de los desplazamientos con los reportados en la literatura (Cuadro 5), este compuesto se elucidó como cirsimarina (Figura 34).

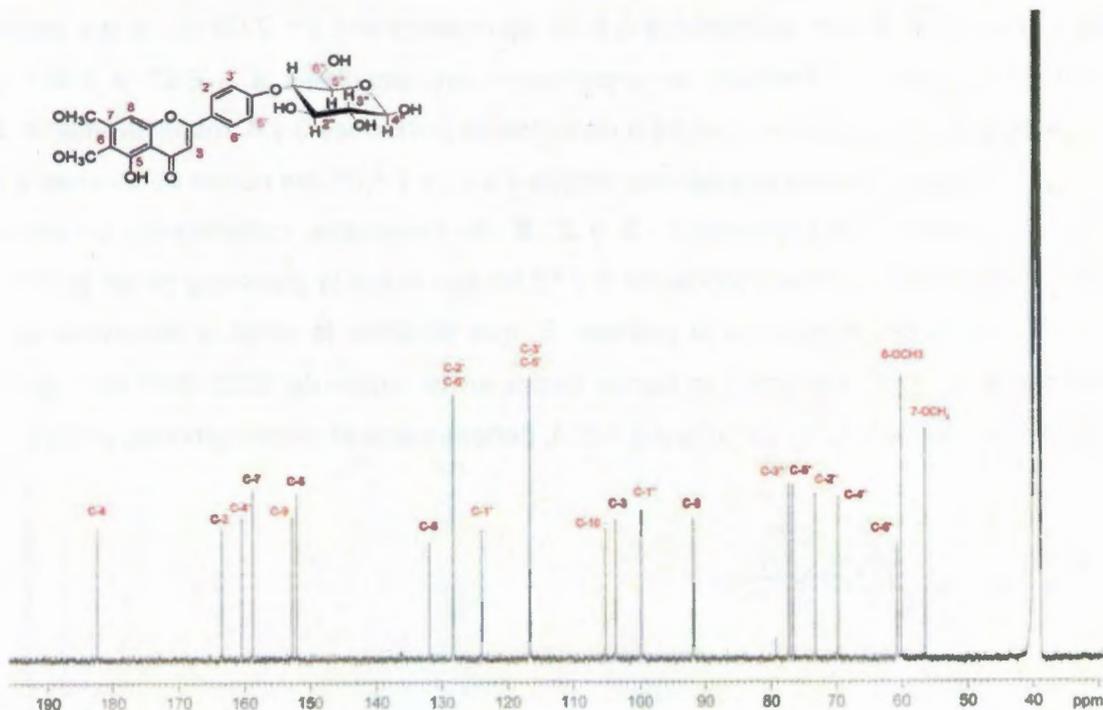


Figura 32. Espectro de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ del compuesto 3 con la estructura de la cirsimarina indicando los carbonos de las señales observadas.

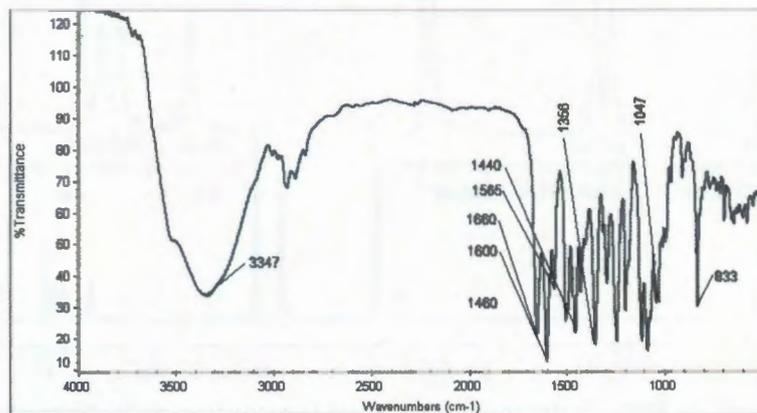


Figura 33. Espectro de IR del compuesto cirsimarina indicando las señales más importantes.

Cuadro 5. Comparación de los desplazamientos del espectro de RMN-¹H (400MHz) del compuesto 3 y de cirsimarina en DMSO.

Posición	Compuesto 3	Cirsimarina ¹	Posición	Compuesto 3	Cirsimarina ¹
6-OCH ₃	3.74	3.75	2''-OH	5.45	5.41
7-OCH ₃	3.93	3.93	H-3	6.97	6.96
6''-OH	4.65	4.62	H-8	6.98	6.97
H-1''	5.05	5.05	H-3',H-5'	7.20	7.21
4''-OH	5.12	5.08	H-2',H-6'	8.08	8.08
3''-OH	5.20	5.15	5-OH	12.86	12.90

¹ Tomado de Yim *et al.*, 2003.

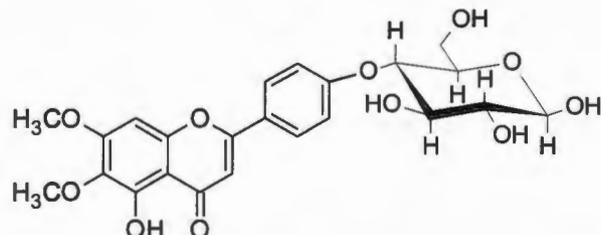


Figura 34. Estructura del compuesto cirsimarina.

La cirsimarina ha sido aislada anteriormente a partir de *Ruellia tuberosa* de la familia Acanthaceae (Lin *et al.*, 2006), *Cirsium lineare* (Jeong *et al.*, 2008) y *Cirsium rhinoceros* (Yim *et al.*, 2003) de la familia Asteraceae, *Teucrium arduini* de las Lamiaceae (Vukovic *et al.*, 2011) y *Microtea debilis* de la familia Phytolaccaceae (Bai *et al.*, 2010).

Dicho compuesto ha sido estudiado recientemente por su actividad lipolítica y antilipogénica en adipocitos humanos, en donde la preincubación de los mismos con cirsimarina en un rango de 1-250 μ M por una hora indujo una estimulación de la lipólisis de manera dosis-dependiente con una IC₅₀ = 28.98 μ M. Asimismo, inhibió la lipogénesis en un rango de menos de un micromol (Soulage *et al.*, 2012).

Por otra parte Vukovic *et al.* (2011) estudiaron la actividad antimicrobiana de este compuesto, encontrando que posee actividad *in vitro* contra *Klebsiella pneumoniae* con una IC₅₀ = 31.25 μ g/mL. En otra investigación, la cirsimarina fue probada *in vitro* contra la

línea celular HepG2 de cáncer de hígado, resultando con una $IC_{50} = 38.83 \mu\text{g/mL}$, lo cual indica una mediana actividad citotóxica (Lin *et al.*, 2006).

3.2.3.2 ANÁLISIS DEL COMPUESTO 4

Este compuesto proviene de la fracción 3 y se obtuvo en forma de cristales amarillos. Es soluble en EtOH y DMSO.

En el espectro de RMN- ^1H de dicho compuesto (Figura 35) se observó una señal de metoxilo a δ 3.90, que es confirmada por la señal a δ 56.3 que indica la presencia de un carbono perteneciente a metoxilo en el espectro de RMN- ^{13}C (Figura 36). También se encontraron dos señales en singulete a δ 6.80 y 6.91, que corresponden a dos protones unidos a carbonos en posiciones 3 y 8, respectivamente. Asimismo, fueron observadas dos señales dobles a δ 6.93 y 7.95, las cuales se asignaron a los protones unidos en las posiciones 3',5' y 2',6' del esqueleto flavonoide, conformando un sistema AA'BB'. Se encontró de igual manera, una señal a δ 12.64 que pertenece al protón de alcohol quelatado unido en la posición 5 y que es posible corroborar con el carbono base de alcohol encontrado a δ 146.2. En el RMN- ^{13}C del compuesto 4 (Figura 36) fue posible confirmar también la presencia de un carbono de grupo carbonilo con una señal a δ 182.2, representado también por una absorción en el IR a 1665 cm^{-1} debida al alargamiento del enlace C=O (Figura 37). Asimismo, se observa una banda ancha en la región de $3377\text{-}2959 \text{ cm}^{-1}$ debida al alargamiento del enlace O-H (Figura 37).

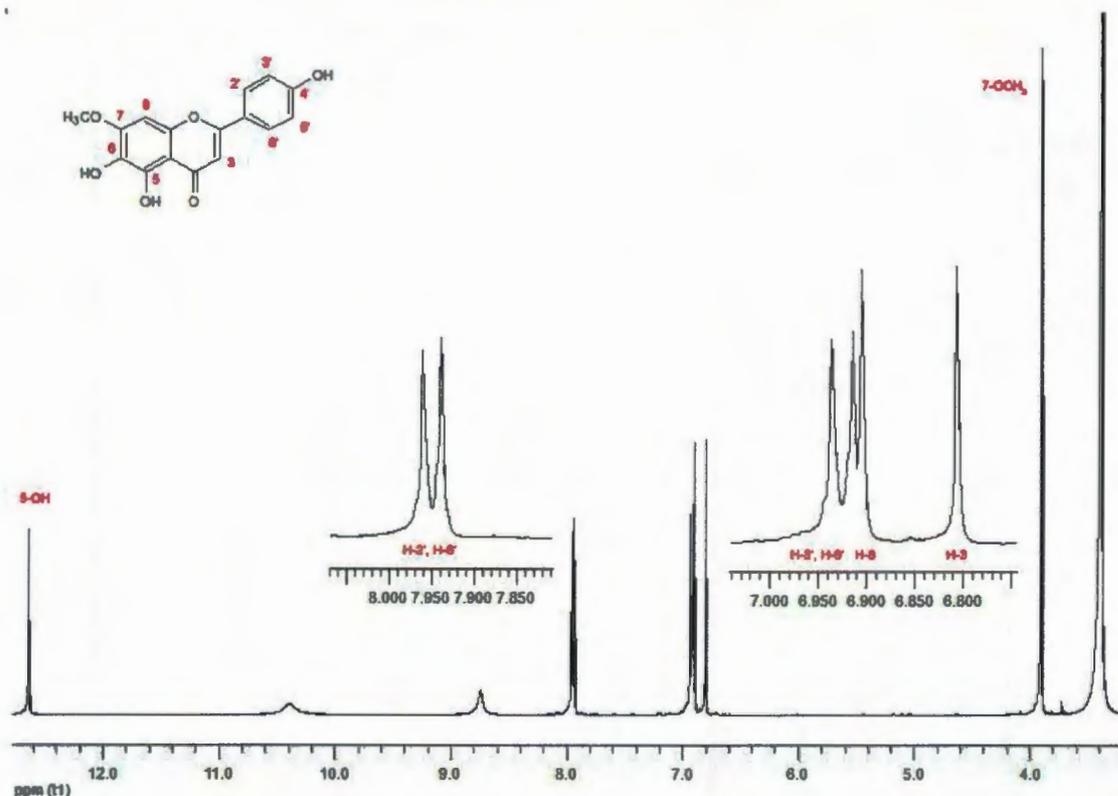


Figura 35. Espectro de RMN- ^1H del compuesto 4 con la estructura del sorbifolín indicando los protones de las señales observadas.

Con los análisis espectroscópicos de protón y carbono, así como por comparación con lo reportado en la literatura (Cuadro 6), se identificó al compuesto como sorbifolín (Figura 38).

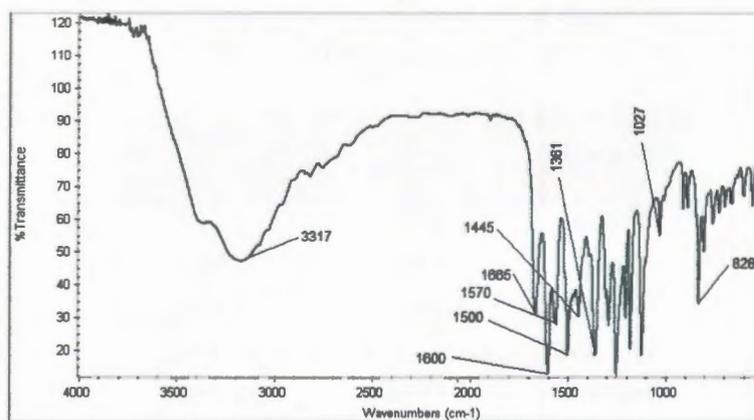


Figura 37. Espectro de IR del compuesto sorbifolín indicando las señales más importantes.

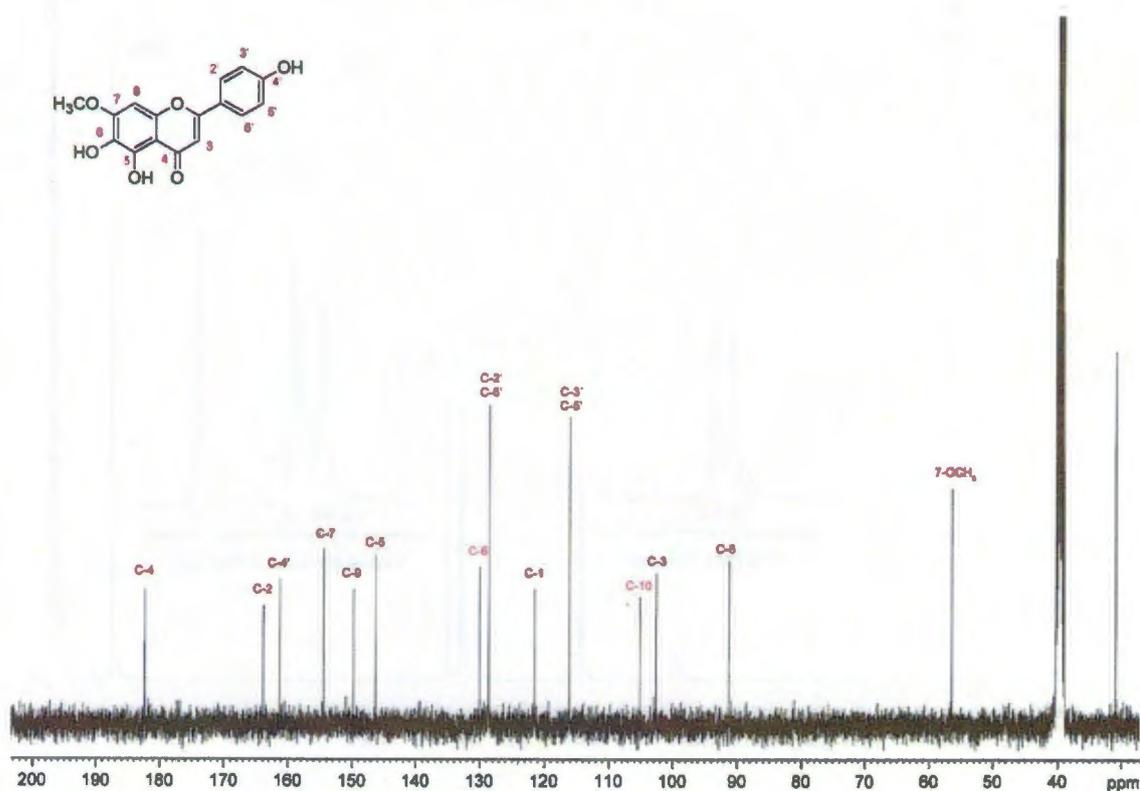


Figura 36. Espectro de RMN-¹³C del compuesto 4 con la estructura del sorbifolín indicando los carbonos de las señales observadas.

Cuadro 6. Comparación de los desplazamientos del espectro de RMN-¹H del compuesto 4 y de sorbifolín en DMSO.

Posición	Compuesto 4 400 MHz	Sorbifolin ¹ 500 MHz
7-OCH ₃	3.91	3.91
H-3	6.81	6.80
H-8	6.91	6.91
H-3',H-5'	6.93 J=8.8	6.93 J=9.0
H-2',H-6'	7.95 J=8.8	7.95 J=9.0
5-OH	12.64	
6-OH		
4'-OH		

¹Tomado de Lin *et al.*, 2006

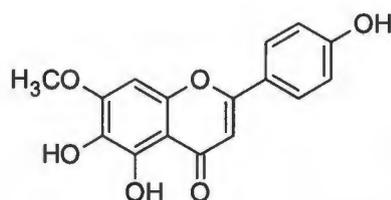


Figura 38. Estructura del compuesto sorbifolín.

El compuesto sorbifolín se aisló por primera vez en 1969 a partir de las hojas de *Sorbaria stellipila* (Rosaceae) y fue caracterizado por RMN así como por diversas reacciones químicas que permitieron elucidar su estructura (Arisawa *et al.*, 1970). Desde entonces, tal metabolito ha sido encontrado en diversas especies de plantas, entre las que se pueden citar *Astragalus annularis* (El-Hawiet *et al.*, 2010) y *Pterogyne nitens* (Fernandes *et al.*, 2008) de la familia Fabaceae, *Heterotheca subaxilaris* (Morimoto *et al.*, 2009) y *Pulicaria uliginosa* de la familia Asteraceae (Eshbakova *et al.*, 1996) además de *Ruellia tuberosa* de la familia Acanthaceae (Lin *et al.*, 2006).

Este flavonoide ha sido evaluado en bioensayos antimicrobianos contra *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, así como en ensayos de actividad antioxidante y como inhibidor de la mieloperoxidasa; sin embargo, en ambos estudios resultó ser inactivo (El-Hawiet *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2008).

3.2.3.3 ANÁLISIS DEL COMPUESTO 5

Este metabolito se obtuvo como un sólido blanco, soluble en DMSO. El rendimiento fue de 5.3 mg.

En el espectro de RMN-¹H de este compuesto (Figura 39) se observó una señal de metoxilo a δ 3.90, que se confirma con la señal del carbono que aparece a δ 56.6 en el espectro de RMN-¹³C (Figura 40). Se muestran también los protones característicos de una unidad de glucosa a δ 3.58, 4.12, 4.32, 4.94, 5.03, 5.05 y 5.17. El protón anomérico a δ 4.94 exhibe una $J = 5.2$ Hz lo que sugiere una configuración β , mientras que los protones en 6''-OH aparecen como señales dd a δ 3.58 y 4.12 con J 's de 11.12 y 10.4 Hz respectivamente, lo que indica una posición geminal entre los mismos. Las señales de carbono del azúcar se observan a δ 60.9, 69.9, 74.2, 76.6, 77.3, 91.7 y 102.7. El espectro

de carbono sugiere también que el azúcar se encuentra en la posición C-6, ya que se desplaza de 129.9 ppm como se observa en sorbifolín (Figura 36) a δ 128.1 en este glucósido. Por otro lado, se encontraron dos señales singulete a δ 6.86 y 6.93 pertenecientes a los protones en posición H-3 y H-8, respectivamente. Los dobletes a δ 6.92 y 7.97 y con $J = 8.7$ Hz, corresponden a los protones en H-3', H-5' y H-2' y H-6', que constituyen un sistema AA'BB'. A δ 13.06 se observó el protón de un hidroxilo quelatado correspondiente a la posición 5 del esqueleto de flavonoide. Asimismo, podemos encontrar un carbono a δ 182.3 asignado al grupo carbonilo y que es confirmado por la señal intensa a 1660 cm^{-1} del espectro IR, donde también es posible apreciar un singulete ancho en la región de $3500\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$, perteneciente a la absorción del grupo OH (Figura 41).

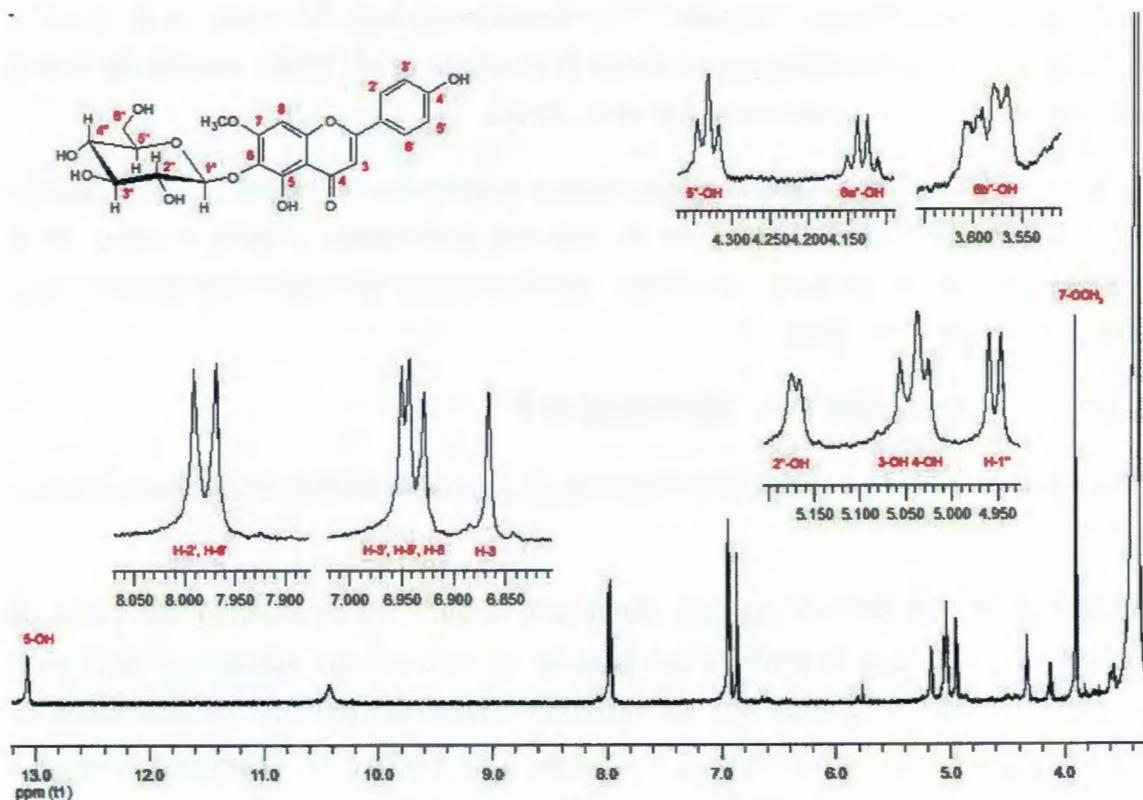


Figura 39. Espectro de RMN- ^1H del compuesto 5 con la estructura de sorbifolín-6-O- β -glucopiranosido indicando los protones de las señales observadas.

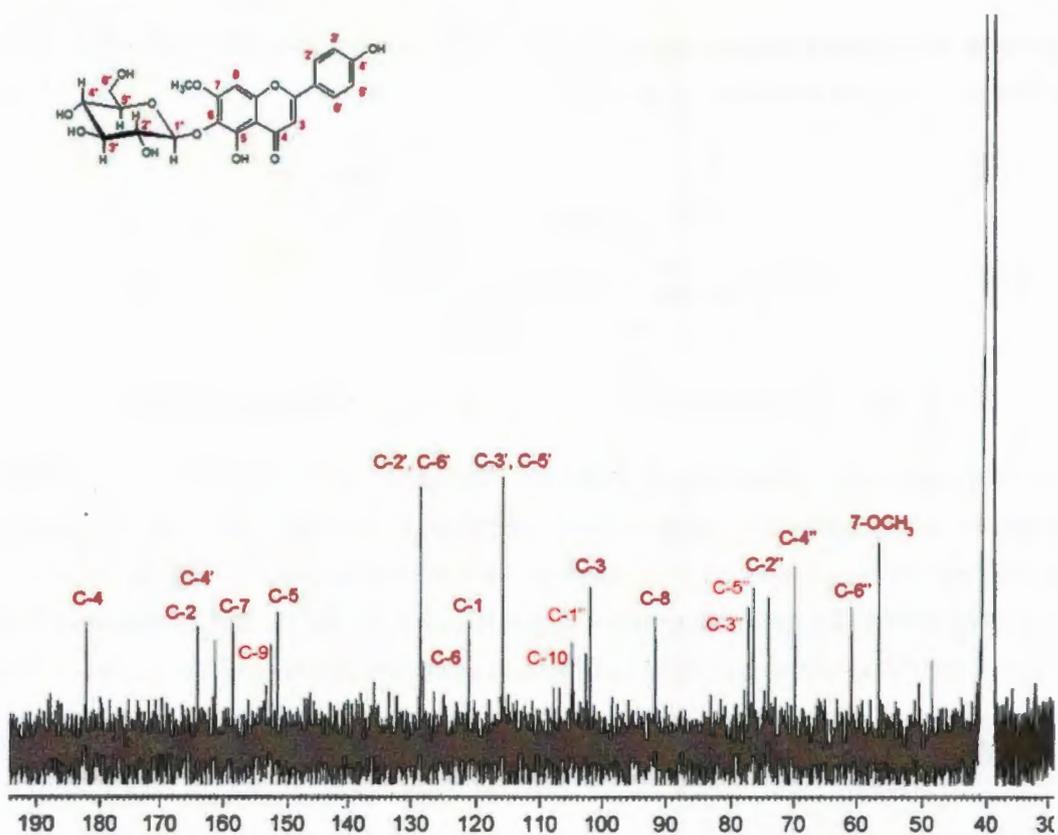


Figura 40. Espectro de RMN-¹³C del compuesto 5 con la estructura de sorbifolín-6-O-β-glucopiranosido indicando los carbonos de las señales observadas.

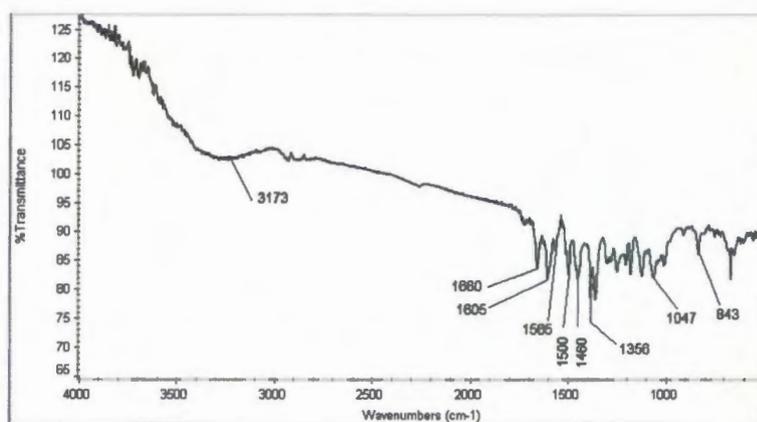


Figura 41. Espectro de IR del compuesto sorbifolín-6-O-β-glucopiranosido indicando las señales más importantes.

De acuerdo a los datos espectroscópicos presentados se identificó al metabolito 5 como sorbifolín-6-O-β-glucopiranosido (Figura 42).

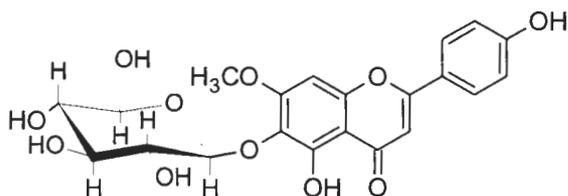


Figura 42. Estructura del compuesto sorbifolín-6-O-β-glucopiranosido.

Este compuesto fue aislado de la especie *Pterogyne nitens* de la familia Fabaceae (Fernandes *et al.*, 2008), donde lo reportan como un compuesto conocido. Asimismo, es evaluado en un bioensayo de inhibición de la mieloperoxidasa (MPO) y de actividad antioxidante ABTS. En este último obtuvo una $IC_{50} = 6.30 \mu M$ de capacidad antioxidante de Trolox, considerándose potencial para su uso como un agente antiinflamatorio.

4. REFERENCIAS

- Arisawa M.; Takakuwa T.; Nakaoki, T. 1970. Studies on unutilized resource. IV. Flavonoids in the leaves of *Sorbaria stellipila* Schneid (Rosaceae). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 18:916-918.
- Awad, R.; Ahmed, F.; Bourbonnais-Spear, N.; Mullally, M.; Ahnh Ta, C.; Tang, A.; Merali, Z.; Maquin P.; Caal, F.; Cal, V.; Poveda, L.; Sanchez Vindas, P.; Trudeau, V.L.; Arnason, J.T. 2009. Ethnopharmacology of Q'eqchi' Maya antiepileptic and anxiolytic plants: Effects on the GABAergic system. *Journal of Ethnopharmacology*, 125:257-264.
- Bai, N.; He, K.; Roller, M.; Lai, C.; Shao, X.; Pan, M.; Bily, A.; Ho, C. 2011. Flavonoid glycosides from *Microtea debilis* and their cytotoxic and antiinflammatory effects. *Fitoterapia*, 82:168-172.
- Baumeler, A.; Hesse, M.; Werner, C. 1999. Benzoxazinoids-cyclic hydroxamic acids, lactams and their corresponding glucosides in the genus *Aphelandra* (Acanthaceae). *Phytochemistry*, 53:213-222.
- Ben Sghaier, M.; Skandrani, I.; Nasr, N.; Dijoux-Franca, M.; Chekir-Ghedira, L.; Ghedira, K. 2011. Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure-activity relationship study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32:336-348.
- Dätwyler, P.; Bosshardt, H.; Bernhard, H.O.; Hesse, M. 1978. Die struktur des spermin-alkaloides aphelandrin aus *Aphelandra squarrosa* Nees. *Helvetica Chimica Acta*, 61:2646-2671.
- Dewick, P.M. 2002. Triterpenes (C30) en: Medicinal Natural Products, a biosynthetic approach. Capítulo 5: The mevalonate and deoxyxylulose phosphate pathways of terpenoids and esterooids. John Wiley and Sons. West Sussex, England.
- El-Hawiet, A.M.; Toaima, S.M.; Assad, A.M.; Radwan, M.M.; El-Sebakhy, N.A. 2010. Chemical constituents from *Astragalus annularis* Forssk. and *A. trimestris* L., Fabaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20:860-865.
- Eshbakova, K.A.; Sagitdinova, G.V.; Malikov, V.M.; Melibaev, S. 1996. Flavone sorbifolin from *Pulicaria uliginosa*. *Chemistry of Natural Compounds*, 32:82.
- Fernandes, D.C.; Regasini, L.O.; Velloso, J.C.R.; Pauletti, P.M.; Castro-Gamboa, I.; Bolzani, V.S.; Oliveira, O.M.M.; Silva, D.H.S. 2008. Myeloperoxidase inhibitory and radical scavenging activities of flavones from *Pterogyne nitens*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 56:723-726.

Flora digital: Península de Yucatán. 2010. *Aphelandra scabra* [Online]. Herbario CICY, Unidad de Recursos Naturales disponible en:

http://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=2294
[Acceso 28 diciembre 2011].

Geissman, T.A.; Mukherjee, R.; Sim, Y. 1967. Constituents of *Helichrysum viscosum* var. *bracteatum* DC. *Phytochemistry*, 6:1575-1581.

Harris, J.C.; Plummer, S.; Lloyd, D. 2001. Antigiardial drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 614-619.

INEGI. 2000. Marco Geoestadístico [Online]. Disponible en: http://mapserver.inegi.org.mx/geografia/espanol/datosgeogra/basicos/estados/yuc_geo.cfm [Acceso 29 diciembre 2011].

Jeong, D.M.; Jung, H.A.; Choi, J.S. 2008. Comparative antioxidant activity and HPLC profiles of some selected Korean thistles. *Archives of Pharmacal Research*, 31:28-33.

Kelm, M.A.; Nair, M.G.; Strasburg, G.M.; DeWitt, D.L. 2000. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. *Phytomedicine*, 7:7-13.

Lentz, D.L.; Clark, A.M.; Hufford, C.D.; Meurer-Grimes, B.; Passreiter, C.M.; Cordero, J.; Ibrahimi, O.; Okunade, A.L. 1998. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 63:253-263.

Lin, C.; Huang, Y.; Cheng, L.; Sheu, S.; Chen, C. 2006. Bioactive flavonoids from *Ruellia tuberosa*. *The Journal of Chinese Medicine*, 17:103-109.

Meurer-Grimes, B.; McBeth, D.L.; Hallihan, B.; Delph, S. 1996. Antimicrobial activity in medicinal plants of the Scrophulariaceae and Acanthaceae. *Pharmaceutical Biology*, 34:243-248.

Morimoto, M; Cantrell, C.L.; Libous-Bailey, L.; Duke, S.O. 2009. Phytotoxicity of constituents of glandular trichomes and the leaf surface of camphorweed, *Heterotheca subaxillaris*. *Phytochemistry*, 70:69-74.

Oganessian, G.B. 2009. Minor flavonols from *Dracocephalum multicaule*. *Chemistry of Natural Compounds*, 45:242-243.

Oyugi, D.A.; Ayorinde, F.O.; Gugssa, A.; Allen, A.; Izevbigie, E.B.; Eribo, B.; Anderson, W.A. 2011. Biological activity and mass spectrometric analysis of *Vernonia amygdalina* fractions. *Journal of Bioscience and Technology*, 2:287-304.

-
- Peraza-Sánchez, S.R.; Cen-Pacheco, F.; Noh-Chimal, A.; May-Pat, F.; Simá-Polanco, P.; Dumonteil, E.; García-Miss, M.R.; Mut-Martín, M. 2007. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatán peninsula. *Fitoterapia*, 78:315-318.
- Quan, Z.; Gu, J.; Dong, P.; Lu, J.; Wu, X.; Wu, W.; Fei, X.; Li, S.; Wang, Y.; Wang, J.; Liu, Y. 2010. Reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction contribute to cirsimaritin-induced apoptosis in human gallbladder carcinoma GBC-SD cells. *Cancer Letters*, 295:252-259.
- Reddy, L.; Couvreur, P. 2009. Squalene: a natural triterpene for use in disease management and therapy. *Advance Drug Delivery Reviews*, 61:1412-1426.
- Soulage, C.O.; Grand, L.; Geloën, A.; Chambert, S. 2012. Total synthesis of cirsimarin and evidence of its lipolytic and antilipogenic activities on human adipocytes. *Tetrahedron Letters*, 53:480-483.
- Stace C.A. 1991. Plant taxonomy and biosystematics. Cambridge University Press. Pp. 86-89.
- Suleimenov, E.M.; Raldugin, V.A.; Adekenov, S.M. 2008. Cirsimaritin from *Stizolophus balsamita*. *Chemistry of Natural Compounds*, 44:398.
- Vukovic, N.; Sukdolak, S.; Solujic, S.; Mihailovic, V.; Mladenovic, M.; Stojanovic, J.; Stankovic, M.S. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of *Teucrium arduini* essential oil and cirsimarin from Montenegro. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5:1244-1250.
- Werner, C.; Hu, W.; Lorenzi-Riatsch, A.; Hesse, M. 1995. Di-coumaroylspermidines and tri-coumaroylspermidines in anthers of different species of the genus *Aphelandra*. *Phytochemistry*, 40:461-465.
- Yim, S.; Kim, H.J.; Lee, I. 2003. A polyacetylene and flavonoids from *Cirsium rhinoceros*. *Archives of Pharmacal Research*, 26:128-131.

CAPÍTULO III: ACTIVIDAD ANTIGIARDIÁSICA *IN VITRO* DEL EXTRACTO METANÓLICO Y METABOLITOS AISLADOS DE *A. SCABRA*

1. INTRODUCCIÓN

A pesar de que han transcurrido 320 años desde que el agente etiológico de la giardiasis fuese observado por primera vez por Leewenhoek, *Giardia lamblia* continua siendo uno de los protozoarios intestinales más reportados en humanos en todo el mundo (Robertson *et al.*, 2009).

Predominantemente asociada con países en vías de desarrollo, donde la infraestructura en higiene puede prestarse a mayores índices de transmisión y establecimiento endémico de tal enfermedad, la giardiasis ha sido incluida en la iniciativa de enfermedades huérfanas de la OMS a partir de 2004 (Savioli *et al.*, 2006).

Sin embargo, a pesar de que se ha reconocido a *G. lamblia* como un importante patógeno para los seres humanos, hay relativamente pocos agentes utilizados para la terapia. Los derivados de nitroimidazol, en especial de la segunda generación, como tinidazol y secnidazol, han probado ser efectivos en una sola dosis, aunque se ha demostrado que algunas cepas son resistentes a ellos. Los tratamientos alternativos como carbamatos de bencimidazol (albendazol) o de tipo tiazoil (nitazoxanida) se usan solos o en combinaciones con el metronidazol (Rossignol, 2010), pero su eficacia en estudios clínicos es controversial.

Por lo anterior, es importante la búsqueda de nuevos, seguros y eficaces agentes para el tratamiento de la giardiasis.

El incremento en el uso de remedios herbolarios, que contienen complejas mezclas de productos naturales, necesita de intensos estudios científicos para establecer la eficacia y seguridad de los mismos, así como estudios clínicos (Bohlin *et al.*, 2010). En este sentido, la evaluación farmacológica de extractos de organismos, así como de compuestos aislados es un aspecto esencial en el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas, y las técnicas *in vitro* han transformado sustancialmente esta faceta de la química de productos naturales (Rahman, 2001).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIGIARDIÁSICA *IN VITRO* DEL EXTRACTO METANÓLICO Y FRACCIONES DE *A. SCABRA*

Se pesaron 20 mg del extracto así como de cada una de las particiones cromatográficas de *A. scabra* y fueron colocados en viales para su evaluación contra *G. lamblia*. Estas muestras fueron llevadas a la Unidad de Investigación Médica Yucatán del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en donde se les practicaron los ensayos de inhibición *in vitro*. Los bioensayos se realizaron como se describe en la literatura (Cedillo *et al.*, 1992). Los tubos con medio TYI-S-33 y extractos diluidos, incluyendo los controles positivo (metronidazol) y negativo (DMSO), se inocularon con *G. lamblia* hasta alcanzar un tamaño de inóculo de 5×10^4 trofozoítos/mL. Después de una incubación durante 48 h a 37 °C, los trofozoítos fueron despegados por enfriamiento y 50 µL de cada tubo de cultivo fueron trasvasados a medio fresco antes del conteo. El número final de parásitos fue determinado por conteo con ayuda de un hemocitómetro.

El porcentaje de inhibición se calculó por comparación con el crecimiento en el medio control. La concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀) se calculó como la concentración de extracto necesaria para inhibir el crecimiento en un 50% de los parásitos en un análisis Probit. Cada experimento fue hecho por duplicado y repetido tres veces. Este bioensayo fue llevado a cabo bajo la supervisión de la Dra. Rosa E. Moo Puc.

Una vez que se obtuvieron los valores de IC₅₀ de las particiones, se escogió la que poseía mayor actividad para seguir con el fraccionamiento de la misma. Dicho fraccionamiento se llevó a cabo por CLV, en donde las fracciones resultantes de este experimento se sometieron nuevamente a bioensayo de inhibición, a fin de encontrar el metabolito responsable de la actividad anti giardiásica.

2.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIGIARDIÁSICA *IN VITRO* DE LOS METABOLITOS AISLADOS DE *A. SCABRA*

Para determinar la actividad anti-giardiasica de los compuestos aislados, se pesaron 3 mg de los mismos y fueron colocados en viales para su evaluacion contra *G. lamblia*. El bioensayo de inhibicion se llevo a cabo como se describe en el apartado anterior.

2.3 DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD *IN VITRO* DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS CIRSIMARITINA Y SORBIFOLÍN

Debido a la promisorio actividad anti-giardiasica presentada por tales compuestos, se realizaron estudios de citotoxicidad *in vitro* con la linea normal de celulas embrionarias de riñon humano (HEK-293). La citotoxicidad fue evaluada en el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), en placas de 96 pozos. La viabilidad celular se midio espectrofotometricamente a 540 nm, despues de la adicion de MTT, como se ha descrito previamente por Rahman *et al.* (2001). Este bioensayo al igual que el de inhibicion *in vitro* de *G. lamblia*, fue llevado a cabo bajo la supervision de la Dra. Rosa E. Moo Puc en la Unidad de Investigacion Medica Yucatan del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ACTIVIDAD ANTIGIARDIÁSICA *IN VITRO* DEL EXTRACTO METANOLICO Y FRACCIONES DE *A. SCABRA*

Respecto a la evaluacion del extracto metanolico y particiones, se encontro que el extracto metanolico posee una buena actividad ($IC_{50} = 11.7 \mu\text{g/mL}$), en tanto que la particion diclorometanica mejoro la misma ($IC_{50} = 2.2 \mu\text{g/mL}$). Las demas particiones no tuvieron actividad inhibitoria (Cuadro 7).

Cuadro 7. Actividad anti-giardiasica del extracto metanólico y fracciones resultantes de la partición con disolventes en gradiente de polaridad.

Extracto	IC ₅₀ (µg/mL)
Extracto metanólico	11.7
Fracción hexánica	NA
Fracción diclorometánica	2.2
Fracción de acetato de etilo	NA
Fracción Acuosa	NA

NA. No activo

La actividad mostrada tanto por el extracto metanólico así como por la partición diclorometánica son elevadas, de acuerdo al criterio de Amaral *et al.* (2006), quienes establecen que una fracción o extracto es altamente activo en concentraciones por debajo de 100 µg/mL.

Debido a que la partición diclorometánica presentó la mayor actividad, fue fraccionada por medio de una CLV, en donde se obtuvieron 11 fracciones. Al terminar el experimento, se tomó una muestra de 5 mg de cada una, para ser evaluada en el bioensayo de inhibición contra *G. lamblia*. Las concentraciones inhibitorias de las mismas se presentan en el Cuadro 8.

Como resultado de este bioensayo, se obtuvieron 4 fracciones activas (4, 6, 7 y 8), una de ellas (8), es el compuesto 3 (cirsimaritina), el cual se encuentra presente en las demás fracciones activas y que probablemente sea responsable de la actividad anti-giardiasica.

Cuadro 8. Actividad anti-giardíasis de las fracciones resultantes de la CLV de la partición diclorometánica.

Fracción	IC ₅₀ (µg/mL)
1	NA
2	NA
3	NA
4	2.5
5	*
6	1.9
7	1.1
8	1.2
9	NA
10	NA
11	NA
Metronidazol	0.2

*Como se observa en la Figura 25A, la fracción 5 tiene la misma composición que la 7, por lo que no fue evaluada. NA: No activa.

3.2 ACTIVIDAD ANTIGIARDÍASICA *IN VITRO* DE METABOLITOS AISLADOS DE *A. SCABRA*

Los metabolitos evaluados en este bioensayo fueron tres: cirsimaritina, procedente la fracción activa (partición diclorometánica), así como cirsimarina y sorbifolín, procedentes de la fracción de acetato de etilo. El compuesto 1 no se evaluó debido a que ya había sido reportado como inactivo para *G. lamblia* con una IC₅₀ = 99.1 µg/mL (Calzada *et al.*, 2005b), mientras que el compuesto 5 se omitió para la evaluación debido a la reducida cantidad que se obtuvo de él. En el Cuadro 9 se muestran las concentraciones inhibitorias al 50% que exhibieron los compuestos evaluados.

Cuadro 9. Actividad anti-giardiasis *in vitro* de los metabolitos aislados.

Compuesto	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ µM
Cirsimaritina	1.2	3.8
Cirsimarina	NA	NA
Sorbifolín	22.7	75.6
Metronidazol	0.2	1.2

NA. No activo

El compuesto con mayor actividad fue cirsimaritina, mostrando una IC₅₀ de 1.2 µg/mL. La actividad de este compuesto es elevada, si se compara con otros productos naturales aislados de plantas y con el metronidazol, fármaco de elección para tratar la giardiasis. Esta es la primera vez que se evalúa dicha molécula contra *G. lamblia*. Sin embargo, ha sido evaluada *in vitro* contra otros protozoarios como *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brunei rhodesiense* y *Trypanosoma cruzi* en donde mostró una IC₅₀ de 3.9, 3.3 y 19.7 µg/mL, respectivamente (Tasdemir *et al.*, 2006).

Por otra parte, el compuesto cirsimarina no mostró actividad inhibitoria. Tal hecho resulta interesante, puesto que la cirsimaritina, su aglicona, presentó la mejor actividad en este estudio. Lo anterior permite aseverar que la inhibición es considerablemente reducida debido a la presencia del azúcar, resultado que concuerda con las observaciones de Calzada y Alanís (2007), quienes analizaron la actividad de flavonoides y sus respectivos glicósidos contra *G. lamblia*, encontrando que la misma decrece con la presencia del grupo glucosil en la posición C-3.

El compuesto sorbifolín alcanzó una IC₅₀ = 22.7 µg/mL. Esta molécula se obtuvo a partir de una fracción no activa, a pesar de lo cual, muestra una actividad que se considera buena de acuerdo al criterio de Amaral *et al.* (2006), pero aún distante de la que presentan fármacos como el metronidazol (0.2 µg/mL). Tal evento podría explicarse de acuerdo al efecto antagonista de otros metabolitos en la fracción de acetato de etilo que disminuyeran o anularan la actividad del sorbifolín.

Como es de notar, los dos compuestos que resultaron activos son flavonoides que tienen la típica estructura de flavona (insaturación entre los carbonos C2 y C3, así como una función ceto en el carbono C4).

La mayoría de las propiedades biológicas de los flavonoides se basan en su actividad captadora de radicales libres y sus efectos sobre algunas enzimas. Sin embargo, en una reciente investigación se habla de que los efectos observados en dichas enzimas no pueden explicar el mecanismo de acción antiangiogénico mostrado por algunos flavonoides evaluados (Barbosa, 2007), lo que permite sugerir que la actividad mostrada por los mismos se debe a su actividad antioxidante.

La capacidad antioxidante de los flavonoides está ligada a su particular estructura química. Los grupos funcionales que influyen en esta capacidad son: a) la estructura orto-dihidroxi en el anillo B (catecol), que confiere gran estabilidad y participa en la deslocalización de electrones, b) el doble enlace en 2,3 en conjugación con la función 4-oxo, responsable de la deslocalización de electrones del anillo C, c) la presencia de grupos hidroxilo en los carbonos 3 y 5 y d) los grupos 5-OH y 7-OH, que pueden tener potencial antioxidante en ciertos casos (Figura 43) (Ben Sghaier *et al.*, 2011; Middleton *et al.*, 2000). Los flavonoides activos encontrados en este estudio comparten algunas de las características estructurales necesarias para su actividad antioxidante. Estas características son importantes debido a que confieren un gran poder de deslocalización electrónica que previene la propagación de reacciones en cadena y la formación de radicales libres de oxígeno (Nijveldt *et al.*, 2001; Middleton *et al.*, 2000).

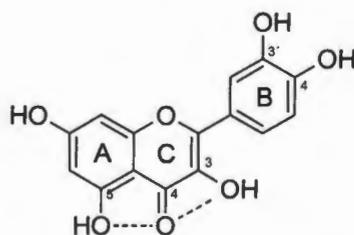


Figura 43. Grupos funcionales de los flavonoides que influyen en la actividad antioxidante.

3.3 CITOTOXICIDAD *IN VITRO* DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS CIRSIMARITINA Y SORBIFOLÍN

Para descartar que la actividad antiangiogénica presentada por los compuestos cirsimaritina y sorbifolín fuera un efecto tóxico, se sometieron a un bioensayo de

citotoxicidad *in vitro* con la línea normal de células embrionarias de riñón humano (HEK-293). Como resultado, se obtuvo que la cirsimarina no es citotóxica en concentraciones hasta 100 µg/mL, mientras que el sorbifolín no es citotóxico en concentraciones hasta 250 µg/mL. Este hecho es congruente con las observaciones de Nijveldt *et al.* (2001), quienes llevaron a cabo una revisión acerca de los efectos que ocasionan los flavonoides de plantas en las diversas células de mamíferos. Ellos advierten que las reacciones secundarias a causa de flavonoides son muy raras en humanos. Tal efecto, reafirma la seguridad del empleo de los flavonoides como posibles agentes terapéuticos, en este caso, contra *G. lamblia*.

4. REFERENCIAS

- Amaral, F.M.M.; Ribeiro, M.N.S.; Barbosa-Filho, J.M.; Reis, A.S; Nascimento, F.R.F.; Macedo, R.O. 2006. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16 (Supl.):696-720.
- Barbosa, E. 2007. Evaluación *in vivo* de la actividad anti-giardia y biotransformación *in vitro* de tres flavonoides de origen natural: camperol, (-)-epicatequina y tilirosido. Tesis de doctorado. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Medicina. México, D.F.
- Ben Sghaier, M.; Skandrani, I.; Nasr, N.; Dijoux-Franca, M.; Chekir-Ghedira, L.; Ghedira, K. 2011. Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure-activity relationship study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32:336-348.
- Bohlin, L.; Göransson, U.; Alsmark, C.; Wedén, C.; Backlund, A. 2010. Natural products in modern life science. *Phytochemistry Reviews*, 9:279-301.
- Calzada, F. 2005b. Additional antiprotozoal constituents from *Cuphea pinetorum*, a plant used in Mayan traditional medicine to treat diarrhea. *Phytoterapy Research*, 19:725-727.
- Calzada, F.; Alanís, A.D. 2007. Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. *Phytotherapy Research*, 21:78-80.
- Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O. 1992. *In-vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *Journal of Medical Microbiology*, 37:221-224.
- Middleton, E.; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52: 673-751.
- Nijveldt, R.J.; van Nood, E.; van Hoom, D.E.C.; Boelens, P.G.; Van Norren, K.; van Leeuwen P.A.M. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74:418-425.
- Rahman, A; Choudhary, M.I.; Thomsen, W.J. 2001. Bioassay Techniques for Drug Development. Taylor and Francis Group, Netherlands, pp-34-35.
- Robertson, L.J.; Hanevik, K.; Escobedo, A.A.; Mørch, K.; Langeland, N. 2009. Giardiasis – why do the symptoms sometimes never stop? *Trends in Parasitology*, 26:75-78.

- Rosignol, J.F. 2010. *Cryptosporidium* and *Giardia*: Treatment options and prospects for new drugs. *Experimental Parasitology*, 124:45-53.
- Savioli, L.; Smith, H.; Thompson, A. 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected diseases initiative'. *Trends in Parasitology*, 22:203-208.
- Tasdemir, D.; Kaiser, M., Brun, R.; Yardley, V.; Schmidt, T.J.; Tosun, F.; Rüedi, P. 2006. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50:1352-1364.

CAPITULO IV: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

1. DISCUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo se realizó un estudio fitoquímico del extracto metanólico de hojas de *Aphelandra scabra*. Inicialmente se llevaron a cabo particiones del extracto con disolventes en gradiente de polaridad como hexano, diclorometano y acetato de etilo. Cada una de las anteriores fue sometida a diversas técnicas de cromatografía en columna a fin de aislar y purificar metabolitos secundarios. En las diferentes etapas de purificación se realizaron bioensayos de inhibición *in vitro* de *G. lamblia* para ubicar la actividad biológica.

Como resultado se obtuvo que el extracto metanólico presentó una $IC_{50} = 11.7 \mu\text{g/mL}$, la cual es buena comparada con la de otros extractos vegetales y de acuerdo al criterio de Amaral *et al.* (2006). En cuanto a las fracciones obtenidas por partición, sólo la diclorometánica resultó activa con una $IC_{50} = 2.2 \mu\text{g/mL}$. Tal hecho nos permite sugerir que en dicha fracción se concentran los metabolitos responsables de la actividad anti-giardiasica presentada por el extracto metanólico.

Respecto a la purificación de las fracciones cromatográficas se obtuvieron cinco compuestos. De la fracción hexánica se purificó escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-, (all-E), 2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno) (compuesto 1), el cual se identificó por comparación de su fragmentación másica con la base de datos NIST. A partir de la fracción diclorometánica, se obtuvo un compuesto de tipo flavonoide identificado como cirsimarina (compuesto 2) de acuerdo a las señales observadas en los espectros de RMN tanto de protón como de carbono, así como por comparación con los datos publicados en la literatura (Lin *et al.*, 2006). Por último, de la fracción de acetato de etilo fueron purificados tres compuestos de tipo flavonoide también identificados como cirsimarina (4',5-dihidroxi-6,7-dimetoxi-4'-O- β -D-glucopiranosido) (compuesto 3), sorbifolín (4',5,6-trihidroxi-7-metoxiflavona) (compuesto 4) y sorbifolin-6-O- β -D-glucopiranosido (4',5-dihidroxi-7-metoxi-6-O- β -D-glucopiranosido) (compuesto 5), de acuerdo a sus espectros de RMN y por comparación con datos reportados anteriormente (Lin *et al.*, 2006; Yim *et al.*, 2003).

Los compuestos cirsimaritina, cirsimarina y sorbifolín fueron sometidos al bioensayo de inhibición contra *G. lamblia*, resultando cirsimaritina con una $IC_{50} = 1.2 \mu\text{g/mL}$. Este compuesto fue el que presentó la mejor actividad y es comparable a la presentada por otros productos naturales reportados en la literatura; asimismo, resulta cercana a la del metronidazol, fármaco de elección para el tratamiento de *G. lamblia*. Por otro lado, cirsimarina no presentó actividad y debido a que corresponde al glucósido del compuesto activo (cirsimaritina), se sugiere que la presencia del azúcar inhibe la actividad biológica de la molécula, lo que concuerda con las observaciones de otros autores (Calzada y Alanís, 2007). En cuanto a sorbifolín, presentó una actividad moderada con una $IC_{50} = 22.7 \mu\text{g/mL}$. Este compuesto posee un grupo hidroxilo en la posición 7, mientras que cirsimaritina tiene un grupo metoxilo en la misma posición. Entonces, es posible deducir que el grupo metoxilo en dicha posición es de gran importancia para mejorar la actividad de la molécula de tipo flavona.

Debido a que los compuestos cirsimaritina y sorbifolín presentaron una elevada actividad anti-giardiasica, fueron sometidos a un bioensayo de citotoxicidad *in vitro* con la línea normal de células embrionarias de riñón humano (HEK-293), teniendo como resultado que cirsimaritina no causa toxicidad en concentraciones hasta $100 \mu\text{g/mL}$, mientras que sorbifolín no es citotóxico en concentraciones hasta de $250 \mu\text{g/mL}$. Este hecho confirma el potencial de cirsimaritina para usarse como agente anti-giardiasico, sin embargo, es necesario continuar con un análisis de actividad y toxicidad *in vivo* para establecer si este flavonoide podría ser usado en seres humanos.

2. CONCLUSIONES GENERALES

El extracto metanólico de hojas de *A. scabra*, así como la fracción diclorometánica, resultaron activos en el bioensayo de inhibición *in vitro* de *G. lamblia*.

Se aislaron cinco compuestos a partir del extracto metanólico de hojas de *Aphelandra scabra*, uno de tipo terpenoide identificado como escualeno, así como cuatro de tipo flavonoide: cirsimaritina, cirsimarina, sorbifolín y sorbifolín-6-O- β -D-glucopiranosido, siendo todos compuestos ya reportados en la literatura.

Dos de los flavonoides evaluados en el bioensayo de inhibición *in vitro* de *G. lamblia* mostraron actividad. El flavonoide con mayor actividad fue la cirsimaritina, mientras que

sorbifolín reportó una actividad moderada. Estos resultados reafirman el potencial de este tipo de compuestos para su empleo como agentes anti-giardíasicos.

Este es el primer estudio en donde se reportan componentes fitoquímicos de la especie *A. scabra*, siendo los metabolitos encontrados nuevos para el género y la especie. Asimismo, es el primer estudio en donde se evalúa esta planta contra el protozooario intestinal *G. lamblia*.

La presencia de flavonoides activos en esta especie constituye una evidencia adicional que explica el uso tradicional de las plantas en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y diarrea, y de la misma manera, sustenta el uso de las mismas como fuente potencial de fitofármacos.

3. PERSPECTIVAS

En estudios sucesivos se propone someter a bioensayo de inhibición *in vivo* de *G. lamblia* tanto el extracto metanólico como los metabolitos aislados para analizar si se conserva o mejora la actividad de los mismos y observar si existe un efecto dosis-dependiente.

Evaluar la toxicidad *in vivo* del compuesto cirsimaritina para evaluar la factibilidad de su empleo en seres humanos.

Realizar modificaciones estructurales a los flavonoides activos de acuerdo a los criterios descritos anteriormente, a fin de mejorar su actividad biológica contra *G. lamblia*.

Continuar realizando estudios fitoquímicos de la especie para ubicar otros posibles metabolitos con potencial farmacológico.

4. REFERENCIAS

- Amaral, F.M.M.; Ribeiro, M.N.S.; Barbosa-Filho, J.M.; Reis, A.S; Nascimento, F.R.F.; Macedo, R.O. 2006. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16 (Supl.):696-720.
- Calzada, F.; Alanís, A.D. 2007. Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. *Phytotherapy Research*, 21:78-80.
- Lin, C.; Huang, Y.; Cheng, L.; Sheu, S.; Chen, C. 2006. Bioactive flavonoids from *Ruellia tuberosa*. *The Journal of Chinese Medicine*, 17:103-109.
- Yim, S.; Kim, H.J.; Lee, I. 2003. A polyacetylene and flavonoids from *Cirsium rhinoceros*. *Archives of Pharmacal Research*, 26:128-131.